

Untersuchungen zu Spezifität und Wirkungsmechanismus der Proteinase K

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Edgar Kraus

Bochum 1976

Untersuchungen zu Spezifität und Wirkungsmechanismus der Proteinase K

Dissertation

zur

**Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der**

**Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum**

von

Edgar Kraus

Bochum 1976



Tag der mündlichen Prüfung : 6. Juli 1976

Dekan : Prof. Dr. G. Snatzke

Referent : Prof. Dr. G. Pfeleiderer

Korreferent : Prof. Dr. P. Fortnagel

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Biochemie
der Abteilung Chemie der Ruhr-Universität Bochum
in der Zeit von Mai 1974 bis Mai 1976 unter der
Anleitung von

Herrn Professor Dr. Gerhard Pfeleiderer

angefertigt.

Herrn Professor Dr. Pfeleiderer gilt mein
Dank für die Überlassung des Themas und
sein Interesse an dieser Arbeit.

Für die Einführung in die Methoden der
analytischen Proteinchemie und die Durch-
führung der Aminosäureanalysen danke ich
Herrn Dr. H.H. Kiltz.

Besonderen Dank schulde ich Herrn
Dr. U. Femfert für zahlreiche Anregungen,
Hinweise und Diskussionen, die bei der
Anfertigung dieser Arbeit sehr hilfreich
waren.

I n h a l t

	Seite
1	<u>Einführung</u> 1
1.1	Allgemeines zur enzymatischen Katalyse 1
1.2	Bereits Bekanntes über die Proteinase K 3
2	<u>Untersuchung der Spaltungsspezifität an der oxidierten Insulin B -Kette</u> 4
2.1	Vergleich Proteinase K - Subtilisin Carlsberg 5
2.2	Abhängigkeit des Spaltungsmusters von den Inkubationsbedingungen 6
2.2.1	Verdauung 1 : 1750, 2 Stunden 6
2.2.2	Verdauung 1 : 100, 6 Stunden 7
2.3	Proteolytische Spezifität der Proteinase K 9
2.3.1	Einfluß der Aminosäureseitenkette auf die Spaltbarkeit von Peptiden 9
2.3.2	Einfluß der Peptidgröße auf ihre Spaltbarkeit 10
2.4	Ähnlichkeit der Proteinase K mit den Subtilisinen 10
2.5	Zusammenstellung der nach der Verdauung der Insulin B -Kette mit Proteinase K isolierten Peptide 12
3	<u>Untersuchungen mit Hilfe synthetischer Substrate</u> 15
3.1	Einführung 15
3.2	Ableitung und Definition der benutzten kinetischen Parameter 18
3.3	Unabhängigkeit der Spezifitätskonstanten von nichtproduktiver Bindung des Substrates 20
3.4	Nachweis einer 1 : 1 Stöchiometrie bei der Spaltung synthetischer Substrate 22
3.5	Untersuchung der Substratanlagerungsstelle 23
3.5.1	Messungen mit spezifischen Substraten 23
3.5.1.1	N-blockierte Aminosäure-4-nitroanilide 23
3.5.1.2	Alanin-Oligopeptid-4-nitroanilide 25
3.5.2	Untersuchung der S ₁ -subsite der Substratanlagerungsstelle mit Monocarbonsäure-4-nitrophenylestern 28

	Seite
3.5.2.1	Einfluß der Kettenlänge der Carbonsäure auf die Reaktionsgeschwindigkeit 29
3.5.2.2	Einfluß sterischer Effekte 30
3.5.2.3	Geringer Einfluß der Kettenlänge auf k_{cat} 32
3.5.2.4	Die Kettenlänge beeinflusst vorwiegend die Bildung des Michaelis-Menten-Komplexes 33
3.5.3	Entwicklung eines Modells für die Struktur der S_1 -subsite der Proteinase K 34
3.6	Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus 37
3.6.1	Messung der Spaltungsgeschwindigkeit ringssubstituierter Phenylacetate 37
3.6.1.1	Unabhängigkeit von k_{cat} von der Ringsubstitution 37
3.6.1.2	Hammett - Analyse 40
3.6.1.2.1	Einfluß der Ringsubstitution auf die Michaeliskonstante K_M 41
3.6.1.2.2	Einfluß der Ringsubstitution auf die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M 42
3.6.1.2.3	Vergleich mit anderen Reaktionen 43
3.6.1.3	Brønsted-Analyse und Folgerungen für den Übergangszustand 45
3.6.1.4	Hydrophobe Effekte der austretenden Gruppe 47
3.6.2	Hinweise auf die Beteiligung einer Histidin-Seitenkette am Katalysemechanismus 50
3.6.2.1	Messung der pH-Abhängigkeit der Spaltung von Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenyl-alanin-4-nitroanilid 50
3.6.2.2	Diskussion eines möglichen kooperativen Reaktionsmechanismus 54
3.6.2.3	Hemmung der Proteinase K durch Diäthylpyrocarbonat 56
4	<u>Zusammenfassung</u> 58
5	<u>Material und Methoden</u> 59
5.1	Material 59
5.2	Methoden zur Untersuchung der Spaltungsspezifität an der oxidierten Insulin B-Kette 60
5.2.1	Verdauungsansätze 60
5.2.1.1	Verdauung 1 : 100, 6 Stunden, Vergleich mit Subtilisin Carlsberg 60

5.2.1.2	Verdauung 1 : 5000, 2 Stunden	61
5.2.1.3	Verdauungen 1 : 1750, 2 Stunden, mit 25 mg Insulin B und 1 : 100, 6 Stunden, mit 70 mg Insulin B	61
5.2.2	Präparative Dünnschichtchromatographie und Papierchromatographie	62
5.2.3	Kationenaustauscherchromatographie	63
5.2.4	Manueller Ninhydrin-Test	63
5.2.5	Identifizierung der Peptide	64
5.3	Präparative Methoden	65
5.3.1	BOC-L-alanin-4-nitrophenylester	65
5.3.2	BOC-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-4-nitroanilid	65
5.3.3	L-Alanyl-L-alanyl-L-alanin-4-nitroanilid- trifluoracetat	66
5.3.4	BOC-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitro- anilid	66
5.3.5	L-Alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitro- anilid-trifluoracetat	67
5.3.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Acetylierung und Glutarylierung von Aminosäurenitroaniliden	67
5.3.6.1	Tabelle der dargestellten an der Aminogruppe geschützten Aminosäure-4-nitroanilide	68
5.3.7	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung ringsubstituierter Phenylacetate	69
5.3.7.1	Tabelle der synthetisierten kernsubstituierten Phenylacetate	70
5.4	Bestimmung der Enzymkonzentration	71
5.5	Durchführung der kinetischen Messungen	71
5.5.1	Messung der pH-Abhängigkeit der Spaltung von Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin- 4-nitroanilid	72
5.6	Untersuchung der Hydroseprodukte bei der enzymatischen Spaltung der Trialanin- nitroanilide	73
5.7	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der substituierten Phenole	73
5.8	Modifizierung der Proteinase K mit Diäthylpyrocarbonat	74
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	75

E n z y m

Proteinase K (EC 3.4.21.?)

aus dem Pilz

Tritirachium album Limber

A b k ü r z u n g e n

BOC	tert.-Butyloxycarbonyl
Hepes	N-2'Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
k_{cat}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
K_M	Michaeliskonstante
MG	Molekulargewicht
NA	Nitroanilid



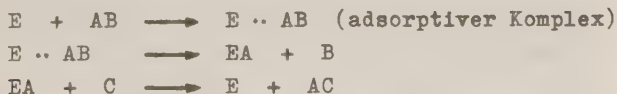
Digitized by the Internet Archive
in 2026

1 E i n f ü h r u n g

1.1 Allgemeines zur enzymatischen Katalyse

Eine der zentralen Fragen, die in der Biochemischen Forschung der letzten Jahrzehnte untersucht wurde, ist die nach der Art und Weise, in der ein Enzym chemische Reaktionen zu katalysieren vermag. Dabei sind prinzipiell zwei Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen, die die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und die Spezifität enzymatischer Reaktionen bewirken können:

- 1) Die Reaktionspartner werden auf der Enzymoberfläche lediglich adsorbiert; dadurch werden ihre reaktiven Zentren so dicht zusammengebracht, daß eine Reaktion wahrscheinlicher wird (proximity effect, orientation effect ⁽¹⁾). Die Größe dieses "Konzentrierungseffektes" reicht aber bei weitem nicht aus, um die Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen zu erklären.
- 2) Das Enzym adsorbiert nicht nur die Reaktionspartner, sondern geht mit mindestens einem von ihnen kovalente Bindungen ein ⁽²⁾. Daraus resultiert eine Aufteilung der Gesamtreaktion in mindestens drei Teilschritte (E = Enzym) :



Diese Aufteilung der Reaktion in mehrere Schritte hat auch dann eine beträchtliche Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit zur Folge, wenn die Summe der Aktivierungsenergien der Einzelschritte genau so groß ist wie die Aktivierungsenergie der direkten Reaktion ⁽³⁾. Ein weiterer Vorteil kovalenter Zwischenprodukte ist entropischer Natur, da die Wahrscheinlichkeit für die

optimale Orientierung eines Substrates an der Enzymoberfläche wesentlich größer ist als für die gleichzeitige sterisch richtige Fixierung zweier Reaktanden ⁽⁴⁾.

Schließlich können im Gegensatz zur unkatalysierten Reaktion bei der enzymatischen Katalyse Bindungsenergien von nicht an der Reaktion beteiligten Gruppen des Substrates ausgenutzt werden, um die zu lösende Bindung dem Übergangszustand anzunähern ^(5,6). Die Faktoren, die auf diese Weise die Effektivität und Spezifität enzymatischer Reaktionen bewirken ⁽⁷⁾, sowie die Struktur der dabei gebildeten Intermediärprodukte konnten für eine Reihe von Enzymen bereits analysiert werden. Trotzdem sind wir von einem völligen Verständnis der enzymatischen Katalyse noch weit entfernt.

Zur Untersuchung der Parameter, die für die spezifische Wirksamkeit der Enzyme eine Rolle spielen, haben sich Proteasen aus mehreren Gründen als gut geeignet erwiesen:

- 1) Sie sind relativ leicht in größeren Mengen zugänglich und meist hinreichend stabil.
- 2) Sie sind meistens Einstrang-Proteine. Dadurch wird die kinetische Analyse infolge des Fehlens von Kooperationseffekten vereinfacht.
- 3) Abgesehen von Wasser, das als Reaktionsmedium im Überschuß vorhanden ist, benötigen sie keine essentiellen Substrate, so daß nur binäre Enzym-Substrat-Komplexe zu analysieren sind.
- 4) Die Mechanismen der nichtenzymatisch katalysierten Spaltung der von Proteasen hydrolysierbaren Verbindungen sind bereits vielfach untersucht worden.

Diese Tatsachen lassen Proteasen als günstige, weil überschaubare Modelle für Enzym-Substrat-Wechselwirkungen erscheinen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Art dieser Wechselwirkungen und ihre Bedeutung für die Katalyse durch systematische Veränderung der Substratstruktur und Analyse ihrer Auswirkungen auf die Umsatzgeschwindigkeit an der Proteinase K (EC 3.4.21.?) untersucht, deren bisher bekannte Eigenschaften im folgenden Abschnitt kurz zusammengefaßt werden sollen (8,9).

1.2 Bereits Bekanntes über die Proteinase K

Die Proteinase K ist eine extrazelluläre Protease, die von dem Pilz *Tritirachium album* Limber neben anderen proteolytischen Enzymen in das Kulturmedium ausgeschieden wird. Das aus diesem Proteasengemisch als Hauptkomponente isolierte und wegen seiner keratinolytischen Aktivität als Proteinase K bezeichnete Enzym besitzt ein Molgewicht von 18500 ± 500 Dalton und einen isoelektrischen Punkt von 8.9.

Weder Chelatbildner wie EDTA* noch Sulfhydrylreagentien wie p-Chlormercuribenzoat oder Jodacetat führen zur Inaktivierung des Enzyms; es wird jedoch durch Phenylmethansulfonylfluorid und Diisopropylfluorphosphat gehemmt und ist daher wie viele andere mikrobielle Proteasen wahrscheinlich als Serin-Protease anzusehen. Die Verwandtschaft mit anderen Enzymen aus Mikroorganismen zeigt sich auch in seiner Hemmbarkeit durch Peptid-Chlormethylketone.

Bereits kurz nach ihrer Entdeckung fand die Proteinase K Verwendung bei der Aufarbeitung von Nucleinsäurepräparaten aus Zellhomogenaten, da sie Nucleasen rasch proteolytisch inaktiviert (10). Ihre Aktivität gegen

* EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure

Makromoleküle wird durch die Gegenwart von Detergentien (Na-Dodecylsulfat) oder Harnstoff scheinbar erhöht, da sie auch noch unter Bedingungen aktiv ist, bei denen die meisten Proteine bereits denaturiert werden und damit ihr hydrolytischer Abbau erleichtert wird ⁽¹¹⁾.

Trotz dieser praktischen Anwendung des Enzyms ist über seine Substratspezifität oder gar den Katalysemechanismus nur wenig bekannt.

2 U n t e r s u c h u n g d e r S p a l t u n g s - s p e z i f i t ä t a n d e r o x i d i e r - t e n I n s u l i n - B - K e t t e

Um erste Anhaltspunkte über die proteolytischen Eigenschaften eines Enzyms zu finden, ist es günstig, Substrate anzuwenden, die von diesem auch unter natürlichen Bedingungen umgesetzt werden. Für diesen Zweck eignet sich als Polypeptid-Substrat bekannter Sequenz besonders das Pankreas-Hormon Insulin, da es leicht in größeren Mengen rein zu erhalten ist und nach Oxidation der Disulfidbrücken und Auftrennung in die Einzelketten ein gut definiertes, relativ übersichtliches Substrat darstellt.

Zudem sind an der hier benutzten Insulin B-Kette bereits eine große Zahl Spezifitätsuntersuchungen durchgeführt worden, so daß anhand der gefundenen Spaltstellen die Proteinase K leicht mit einer Vielzahl anderer Proteasen verglichen werden kann.

2.1 Vergleich Proteinase K - Subtilisin Carlsberg

Da Untersuchungen der Spaltbarkeit von synthetischen, niedermolekularen Substraten bereits Ähnlichkeiten der Proteinase K mit bakteriellen Proteasen, insbesondere den Subtilisinen andeuten (8,9), wurden zunächst Verdauungsansätze der oxidierten Insulin B-Kette mit Proteinase K und Subtilisin Carlsberg über einen Aminosäure-Analysator chromatographiert (Abb. 1):

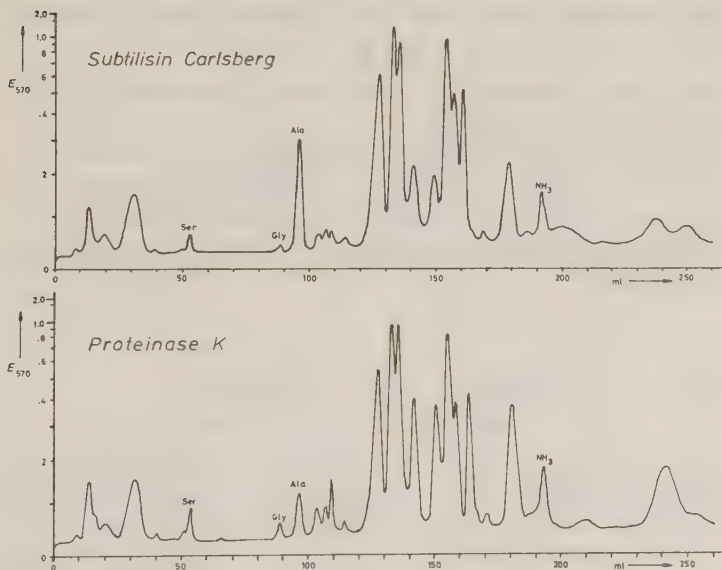


Abb. 1 Elutionsdiagramme von Verdauungsansätzen von oxidiertem Insulin B mit Subtilisin Carlsberg bzw. Proteinase K auf einem Aminosäure-Analysator (BC 200). Gewichtsverhältnis Enzym/Substrat: 1/100, 2h, 25°C Alanin als größter Peak freier Aminosäuren wurde in Mengen von 15.4 % (Subtilisin Carlsberg) und 5.03 % (Proteinase K) gefunden.

Aus der in Abb. 1 dargestellten fast völligen Identität der Elutionsdiagramme konnte eine weitgehende Analogie der Spaltungsspezifität gefolgert werden.

2.2 Abhängigkeit des Spaltungsmusters von den Inkubationsbedingungen

Die zu vermutende Ähnlichkeit wurde durch Isolierung und Identifizierung der nach verschiedenen Inkubationszeiten auftretenden Oligopeptide erhärtet.

Nach zweistündiger Verdauung durch Proteinase K mit einem Gewichtsverhältnis 1 : 5000 war kein intaktes Insulin B mehr aufzufinden, sondern nur die Peptide Phe(1) -- Leu(15) und Tyr(16) -- Ala(30). Die Bindung zwischen Leu(15) und Tyr(16) ist auch die erste, die durch die Subtilisine Carlsberg und Novo angegriffen wird (12).

2.2.1 Verdauung 1 : 1750, 2 Stunden

Nach einer zweistündigen Verdauung mit einem Enzym-Substratverhältnis 1 : 1750 konnten 10 Peptide isoliert und damit 5 Spaltstellen bewiesen werden (Abb. 2). Wie die Abbildung ebenfalls zeigt, stimmen die Spaltstellen der Proteinase K bis auf eine mit denen des Subtilisin Carlsberg überein (Pfeile). Als Unterschied fällt jedoch auf, daß unter diesen Bedingungen keine Bruchstücke des Peptids Tyr(16) -- Ala(30) zu finden waren, sondern dieses fast völlig zurückgewonnen werden konnte.

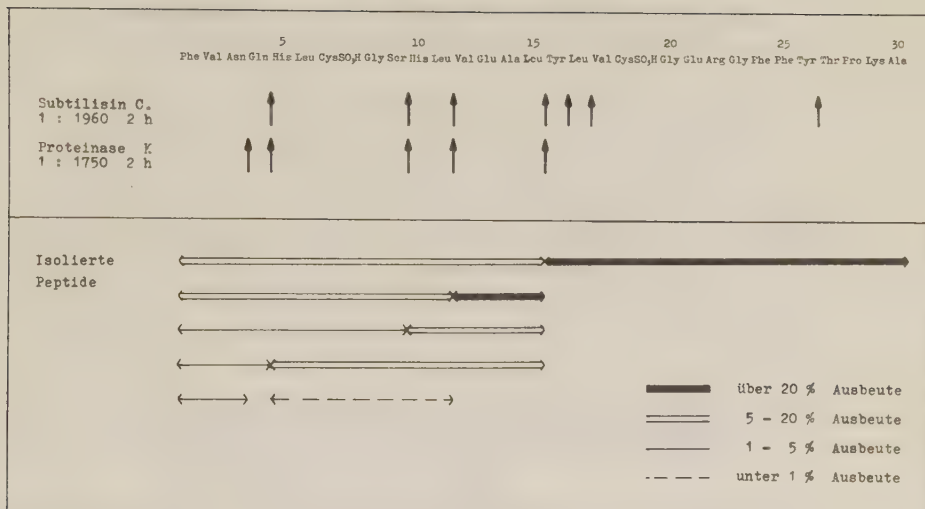


Abb. 2 Zusammensetzung der nach zweistündiger Verdauung mit Proteinase K (1 : 1750) isolierten Peptide.
(Genaue Daten siehe Tabelle 1a, 2.5)

Die gefundenen Spaltstellen (Pfeile) stimmen bis auf eine mit denen des Subtilisin Carlsberg (12) überein.

2.2.2 Verdauung 1 : 100, 6 Stunden

Aus diesem Grunde wurde ein weiterer Verdauungsansatz unter rigoroseren Bedingungen durchgeführt (Enzym-Substratverhältnis 1 : 100, 6 h). Danach konnte eine große Zahl kurzer und teilweise überlappender Peptide isoliert werden, die einen recht weitgehenden Abbau der Insulin B-Kette anzeigen (Abb. 3):

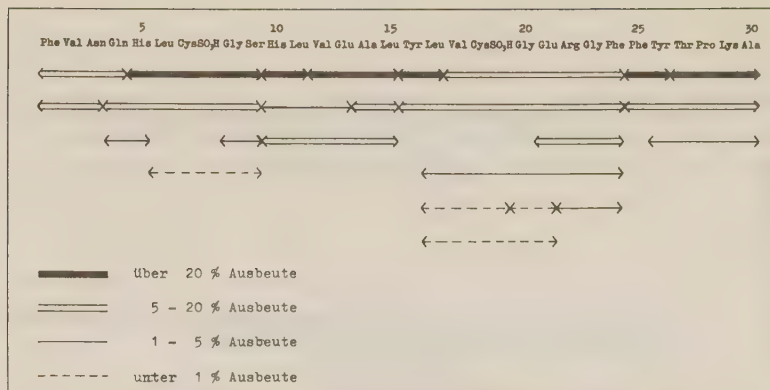


Abb. 3 Zusammensetzung der nach sechsständiger Verdauung mit Proteinase K (1 : 100) isolierten Peptide (Genaue Daten siehe Tabelle 1b, 2.5.)

Betrachtet man nun die Anzahl der nach verschiedenen Inkubationszeiten gefundenen Spaltstücke, so sieht man, daß sich deren Größe und Zahl durch geeignete Wahl der Verdauungsbedingungen in weitem Rahmen beeinflussen läßt:

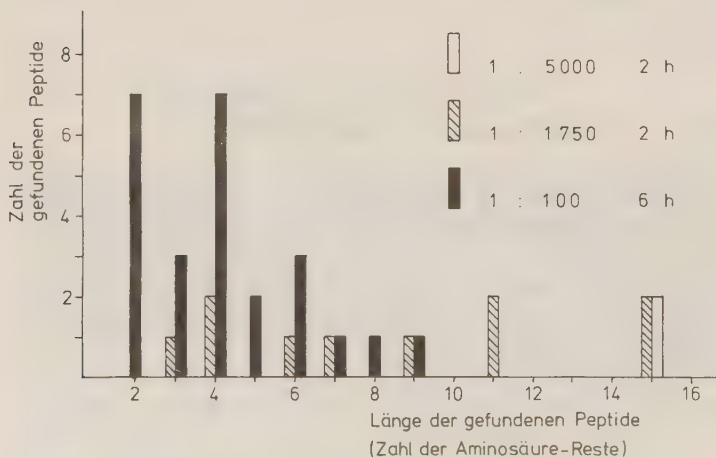


Abb. 4 Zahl und Größe der nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Proteinase K gefundenen Fragmente der oxidierten Insulin B-Kette

2.3 Proteolytische Spezifität der Proteinase K

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich ganz eindeutig, daß die Proteinase K eine sehr breite Spezifität besitzt, die auf keinen Fall mit der des Trypsins oder des Chymotrypsins zu vergleichen ist. Diese Eigenart trifft für die meisten aus Mikroorganismen isolierten Proteasen zu (13,14), die wegen ihrer Hemmbarkeit durch Diisopropylfluorophosphat als Serin-Proteasen angesehen werden.

2.3.1 Einfluß der Aminosäureseitenkette auf die Spaltbarkeit von Peptiden

Einige allgemeine Regeln über die Spaltbarkeit von Peptidbindungen durch Proteinase K lassen sich jedoch aufstellen: Am schnellsten werden solche von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten gespalten. Aber auch Peptidbindungen von Aminosäuren, die polare Seitenketten tragen, werden angegriffen. An der Aminogruppe von Glutaminsäure, Glutamin und Arginin findet genau so eine Spaltung statt wie an der Carboxylgruppe von Cysteinsäure, Glutaminsäure, Glutamin und Asparagin. Ob Proteinase K eine Amino-Endopeptidase oder Carboxyl-Endopeptidase ist, kann daher aus diesen Untersuchungen nicht geschlossen werden und ist wohl nur durch umfangreiche Versuche mit Hilfe synthetischer Substrate zu klären. Keine Hydrolyse findet an der Aminogruppe der Cysteinsäure(7,19) sowie der von Prolin(28) und Lysin(29) statt. Andererseits wird aber die Bindung Glu(21) - Arg(22) gespalten, so daß es scheint, als ob Prolin als zyklische Aminosäure den Angriff des Enzyms sowohl an seiner Amino- als auch an seiner Carboxylgruppe verhindert (Vgl. hierzu 3.5.1.1).

2.3.2 Einfluß der Peptidgröße auf ihre Spaltbarkeit

Die Bindung zwischen Histidin und Leucin wird in einem Fall gespalten [His(5)-Leu(6)], im anderen dagegen [His(10)-Leu(11)] nicht.

Dieser Befund lenkt die Aufmerksamkeit auf eine wichtige Eigenschaft der Proteinase K: Sie spaltet offenbar von Peptiden keine einzelnen Aminosäuren ab und benötigt deshalb als kleinstes Substrat mindestens ein Tetrapeptid. Die der Bindung His(5)-Leu(6) benachbarten Bindungen Asn(3)-Gln(4) und Gln(4)-His(5) werden etwa gleich schnell hydrolysiert, so daß das Dipeptid Gln(4) -- His(5) von einem längeren Peptid abgespalten werden kann. Diese Möglichkeit besteht beim His(10) nicht, weil die Bindung Ser(9)-His(10) sehr schnell angegriffen wird und so eine Spaltung zwischen His(10) und Leu(11) die Freisetzung einer einzelnen Aminosäure zur Folge hätte. Diese Deutung wird erhärtet durch die Tatsache, daß trotz der vielen Peptidfragmente, die bei einer sechsstündigen Verdauung im Verhältnis 1 : 100 entstehen (Abb. 3), unter diesen Bedingungen kaum freie Aminosäuren nachweisbar sind (Abb. 1, 5.03 % Alanin als höchster Wert).

2.4 Ähnlichkeit der Proteinase K mit den Subtilisinen

Zusammenfassend kann man sagen, daß die anfangs vermutete Ähnlichkeit der Spaltspezifität zwischen der Proteinase K und den Subtilisinen (Abb. 1) durch die weiteren Untersuchungen voll bestätigt wurde, wie sich durch eine Gegenüberstellung der Spaltstellen zeigen läßt. Die größere Zahl der gefundenen Spaltstellen bei der Proteinase K ist wahrscheinlich durch die veränderten Inkubationsbedingungen zu erklären (Abb. 5):

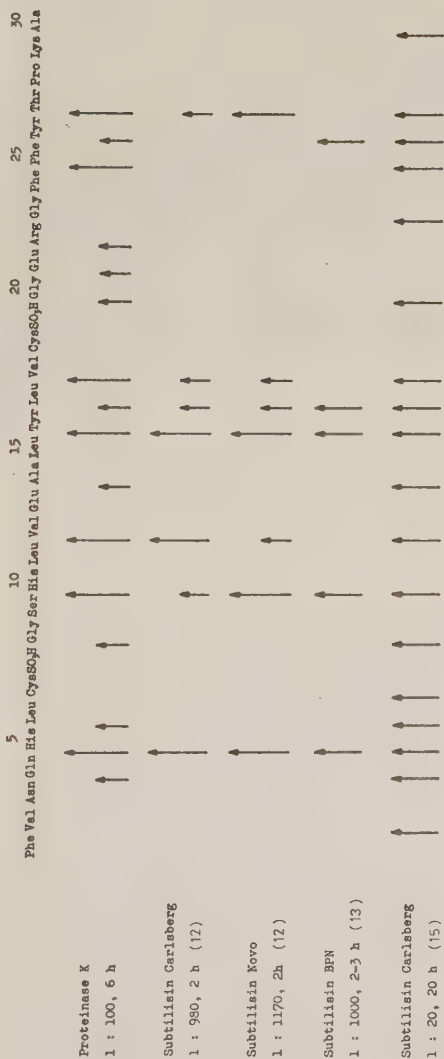


Abb. 5 Vergleich der Spaltstellen der oxidierten Insulin B-Kette durch Proteinase K und verschiedene Subtilisine.

In den Fällen, wo zwei verschiedene Pfeilgrößen dargestellt sind, bezeichnen die längeren Pfeile Ausbeuten der betreffenden Peptide von mehr als 20 Prozent.

Wie aus der untersten Reihe der Abb. 5 zu erkennen ist, kann auch durch Anwendung von Subtilisin bei entsprechender Wahl der Bedingungen ein sehr weitgehender Abbau des Substrates erreicht werden*⁽¹⁵⁾.

Diese erstaunliche Übereinstimmung der proteolytischen Eigenschaften der Proteinase K mit den Subtilisinen läßt vermuten, daß diese Enzyme trotz des unterschiedlichen Molekulargewichtes (Proteinase K: 18500 Dalton, Subtilisine 24000 - 28000 Dalton) und der Herkunft aus völlig verschiedenen Organismen (Pilz - Bacillus) im aktiven Zentrum und in dessen Umgebung sehr ähnliche Strukturen besitzen.

2.5 Zusammenstellung der nach der Verdauung der Insulin B-Kette mit Proteinase K isolierten Peptide

Die aufgeführten Peptide wurden nach den im Abschnitt "Methoden zur Untersuchung der Spaltungsspezifität an der oxidierten Insulin B-Kette" angegebenen Verfahren isoliert. Die Art der Nachreinigung ist durch DC oder PC (Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie) bezeichnet, das hierzu verwendete Fließmittel durch a und b. Bei den tabellierten Aminosäure-Analysen wurden nur die Aminosäuren aufgeführt, deren Menge mindestens 30% der zur Berechnung zugrundegelegten Aminosäure betrug, und zwar sind zuerst die anhand der Basis-Aminosäure errechneten Werte und dahinter die der Peptidzusammensetzung entsprechenden ganzzahligen Werte angegeben.

* Allerdings ist es wahrscheinlich, daß zum Zeitpunkt dieser Untersuchung (1953) kein hinreichend gereinigtes Enzym zur Verfügung stand, so daß ein Teil der hier gefundenen Spaltstellen auf Kontamination mit Fremdaktivitäten zurückzuführen sein könnte.

Tabelle 1b (Fortsetzung)

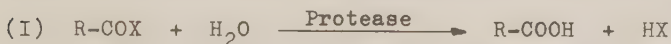
Fraktion Nr.	10	11	12	13	14	15	16	17
Nachreinigung	PC a	DC a	DC a		DC b			DC a
Insulin B Fragment	Gly 20 Glu 21	His 5 Ser 9	Gly 8 Ser 9	Tyr 16 Phe 24	Phe 1 Asn 3	Ala 14 Leu 15	Tyr 16 Leu 17	Thr 27 Ala 30
Ausb. %	0.89	27.2	3.3	8.5	8.3	14.4	20.0	60.0
Amino-terminus		His					Tyr	
CysSO ₃ H		0.81/1		0.78/1	1.10/1			
Asp								0.99/1
Thr								
Ser		1.09/1	1	1.37/1				0.93/1
Glu	1							
Pro								
Gly	1.00/1	1	1.00/1	2		0.92/1		1
Ala				1.13/1	0.91/1			
Val				1.33/1			1.04/1	
Leu		0.88/1		0.95/1	1.12/1		0.97/1	
Tyr				0.76/1				
Phe								
His		0.97/1						0.94/1
Lys				1.06/1				
Arg								

Fraktion Nr.	18	19	20	21	22	23	24	25
Nachreinigung	DC a				DC b	DC b		
Insulin B Fragment	His 10 Leu 15	Phe 25 Tyr 26	Tyr 26 Ala 30	His 10 Glu 13	Glu 21 Phe 24	Phe 25 Ala 30	His 10 Leu 11	Arg 22 Phe 24
Ausb. %	9.3	33.1	2.3	4.8	11.3	9.7	73.6	4.6
CysSO ₃ H								
Asp	0.99/1	1.18/1				1.17/1		
Thr								
Ser	1.20/1		1.05/1	1.12/1	0.88/1	1.07/1		
Glu								
Pro								
Gly			1	0.40	1.24/1	1		1
Ala	1			0.85/1				
Val	0.92/1							
Leu	1.70/2	1	0.80/1	1		0.79/1	1	0.85/1
Tyr		0.97/1			1	1.22/1		
Phe				0.81/1			0.99/1	
His	0.82/1		0.99/1		0.87/1	1.04/1		0.93/1
Lys								
Arg								

3 U n t e r s u c h u n g e n m i t H i l f e s y n t h e t i s c h e r S u b s t r a t e

3.1 Einführung

Zur genaueren Untersuchung der katalytischen Eigenschaften von Proteasen ist die Anwendung synthetischer Substrate von Vorteil, da diese aufgrund ihres gegenüber Proteinen und Peptiden wie z. B. Insulin wesentlich geringeren Molgewichtes und ihrer einfacheren Struktur ein übersichtlicheres Untersuchungssystem darstellen. Außerdem kann man die Tatsache ausnutzen, daß Proteasen, die ja die Reaktion



mit $X = -OR, -NH_2, -NHR, -NHNH_2, -NHOH$

katalysieren, Substrate mit sehr verschiedenem Rest R und austretender Gruppe X umsetzen können. Die Struktur von R entscheidet dabei darüber, ob das Substrat R-COX überhaupt angegriffen wird, während X meistens nur die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst. So lassen sich durch Änderung von R hauptsächlich Schlüsse auf die Struktur der Substratanlagerungsstelle ziehen, während sich durch Variation des Substituenten X unter Umständen weitgehende Rückschlüsse auf den Katalysemechanismus, das heißt die Art der Zwischenprodukte der Reaktion und die Reihenfolge ihrer Bildung sowie die Struktur der zugehörigen Übergangszustände ergeben können.

Ein weiterer Vorteil synthetischer Substrate besteht in der Möglichkeit, in die austretende Gruppe Chromophore einzuführen, die eine einfache photometrische Messung der Spaltungsgeschwindigkeit zulassen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit für kinetische Messungen hauptsächlich Nitrophenylester und Nitroanilide eingesetzt, bei deren Spaltung Nitrophenol bzw. Nitroanilin entsteht. Die Absorptionsmaxima dieser Verbindungen liegen in einem Spektralbereich, in dem Proteine normalerweise nicht absorbieren, und ihre großen Extinktionskoeffizienten

$$\text{Nitrophenol: } \epsilon_{405} = 10^4 \quad (\text{pH } 7.0)$$

$$\text{Nitroanilin: } \epsilon_{405} = 9.62 \times 10^3 \quad (\text{pH } > 3)$$

ermöglichen auch bei kleinen Substratkonzentrationen und geringen Reaktionsgeschwindigkeiten genaue Messungen.

Wie eingangs erwähnt, reagieren Proteasen mit Substraten R-COX nur, wenn deren Substituent R bestimmte Strukturen besitzt. In diesem Sinne muß man die Spezifität von Enzymen als relative kinetische Spezifität ansehen, die sich darin manifestiert, daß eine bestimmte Verbindung von einem Enzym schneller umgesetzt wird als eine andere ⁽¹⁶⁾. Dann ist das Enzym umso spezifischer, wenn es nur mit wenigen Substraten - im Grenzfall mit einem - reagiert und diese Reaktion schneller abläuft als die anderer Enzyme mit demselben Substrat.

Die gleiche Betrachtungsweise läßt sich entsprechend auch auf Substrate anwenden. So bezeichnet man im Falle der proteolytischen Enzyme Aminosäureester, -amide, -anilide und ähnliche Verbindungen sowie Oligopeptide und deren Derivate als spezifische Substrate, da von ihnen jede Protease meist nur bestimmte Verbindungen spaltet.

Daneben gibt es eine Vielzahl von unspezifischen Substraten, deren Spaltung außer durch viele Proteasen auch durch andere Enzyme oder nichtenzymatische Katalysatoren erfolgt. Zu diesen Verbindungen, die hauptsächlich für mechanistische und Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen verwendet werden, zählt insbesondere eine Reihe von Carbonsäurederivaten, z. B. Propionsäure-4-nitrophenylester. Dieser aktivierte Ester reagiert zwar praktisch mit jedem Nucleophil, aber nur seine enzymatische Hydrolyse kann als kooperativ katalysierte Reaktion aufgefaßt werden, da ihre Effektivität durch die Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen im Enzym vorhandenen reaktiven Gruppen keinesfalls erklärt werden kann.

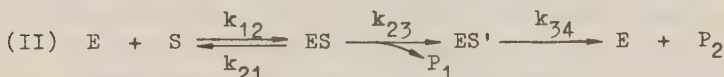
Von den N-Acetyl-aminosäure-methylamiden, die für diese Betrachtung als Modelle von Aminosäure-Seitenketten in Proteinen dienen können, werden nur die Derivate des Lysins ($k_2 = 6.16 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$), Tyrosins ($k_2 = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) und Histidins ($k_2 = 4.33 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) mit meßbarer Geschwindigkeit durch 4-Nitrophenylpropionat acyliert ⁽¹⁷⁾. Daraus läßt sich für die Acylierungsgeschwindigkeit der Proteinase K, die 6 Lysin-, 10 Tyrosin- und 4 Histidin-Seitenketten enthält ⁽¹⁸⁾, ein Wert von $0.069 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ berechnen. Der tatsächlich gemessene Wert $3540 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ist etwa 50 000 mal so groß und läßt sich nur durch eine echte kooperative Katalyse innerhalb des wohlgeordneten aktiven Zentrums des Enzyms erklären.

Sollen jedoch die mit Hilfe labiler Ester wie 4-Nitrophenylpropionat gewonnenen Erkenntnisse auf den Hydrolysemechanismus spezifischer Substrate, z. B. Aminosäurederivate oder Peptide übertragen werden, so ist in jedem einzelnen Fall zu prüfen, ob deren Spaltung über genau denselben Reaktionsmechanismus verläuft. Dies konnte inzwischen für die am besten untersuchten Pankreasproteasen Trypsin und Chymotrypsin bestätigt werden ^(19 - 22).

3.2 Ableitung und Definition der benutzten

kinetischen Parameter

Für die katalytische Spaltung von Substraten durch Proteasen wird im allgemeinen folgender Minimal-Reaktionsmechanismus angenommen ^(23 - 27) :



Daraus ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit v unter steady-state-Bedingungen ⁽²⁸⁾ :

$$(III) \quad v = k_{34} [ES'] = \frac{k_{12} k_{23} k_{34} [E] [S]}{k_{12}(k_{23} + k_{34})[S] + k_{34}(k_{21} + k_{23})}$$

oder in Michaelis-Menten-Schreibweise:

$$(IV) \quad v = \frac{\frac{k_{23} k_{34}}{k_{23} + k_{34}} [E] [S]}{[S] + \frac{k_{34} (k_{21} + k_{23})}{k_{12} (k_{23} + k_{34})}} \quad \text{mit}$$

$$(V) \quad k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} = \frac{k_{23} k_{34}}{k_{23} + k_{34}} \quad \text{und}$$

$$(VI) \quad K_M = \frac{k_{34} (k_{21} + k_{23})}{k_{12} (k_{23} + k_{34})}$$

Für den Quotienten $\frac{k_{cat}}{K_M}$ folgt dann:

$$(VII) \quad \frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{12} k_{23}}{k_{21} + k_{23}} = \frac{k_{23}}{K_S} \quad \text{mit } K_S = \frac{k_{21} + k_{23}}{k_{12}}$$

Die Größe k_{cat}/K_M ist identisch mit der Geschwindigkeitskonstanten für eine Reaktion zweiter Ordnung, wie aus einem Vergleich der Geschwindigkeitgleichungen hervorgeht:

$$(VIII) \quad v = k_2 [E] [S] \quad (\text{Reaktion zweiter Ordnung})$$

$$(IX) \quad v = \frac{k_{cat} [E] [S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Michaelis-Menten-Gleichung})$$

Bei kleinen Substratkonzentrationen ($[S] \ll K_M$) geht die Michaelis-Menten-Gleichung unmittelbar in Gleichung (VIII) über mit $k_2 = k_{cat}/K_M$. Dieser Sachverhalt läßt sich graphisch folgendermaßen veranschaulichen:

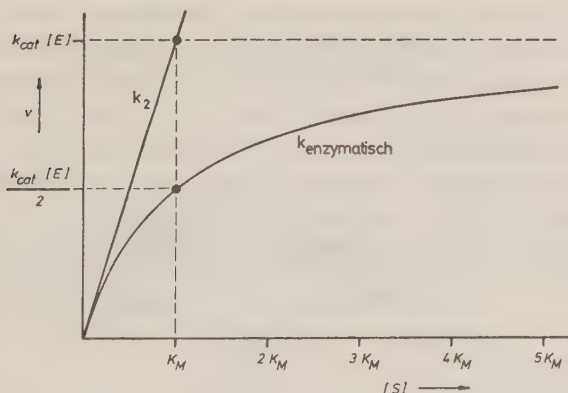


Abb. 6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von $[S]$

Daraus folgt für die Reaktionsgeschwindigkeit nach Umformung in die Michaelis-Menten-Form:

$$(IVa) \quad v = \frac{\frac{k_{23} k_{34}}{k_{23} + k_{34} + \frac{k_{34} (k_{21} + k_{23})}{k_{12} K_1}} [E] [S]}{[S] + \frac{k_{34} (k_{21} + k_{23})}{k_{12} \left(k_{23} + k_{34} + \frac{k_{34} (k_{21} + k_{23})}{k_{12} K_1} \right)}}$$

Wie sofort zu erkennen ist, tritt sowohl in dem Ausdruck für k_{cat} als auch in dem für K_M der zusätzliche Term

$$\frac{k_{34} (k_{21} + k_{23})}{k_{12} K_1} = k_{34} \frac{K_s}{K_1} \text{ auf,}$$

so daß für k_{cat}/K_M unverändert resultiert:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{12} k_{23}}{k_{21} + k_{23}}$$

Die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M wurde daher in der vorliegenden Arbeit als Hauptkriterium für die Interpretation der Ergebnisse herangezogen.

3.4 Nachweis einer 1 : 1 Stöchiometrie bei der Spaltung synthetischer Substrate

Die der Reaktionsgleichung (II) entsprechende Bildung stöchiometrischer Mengen Produkt aus dem Substrat wurde für 4-Nitrophenylacetat durch die Beobachtung eindeutiger isosbestischer Punkte während der enzymatischen Hydrolyse fast bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion nachgewiesen ⁽³¹⁾. Synchron mit der Abnahme der Absorptionsbande des Esters ($\lambda_{\max} = 273 \text{ nm}$) wurden die Absorptionsbanden des Nitrophenols sichtbar, das unter den Versuchsbedingungen zum Teil undissoziiert ($\lambda_{\max} = 318 \text{ nm}$) und zum Teil dissoziiert ($\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$) vorlag:

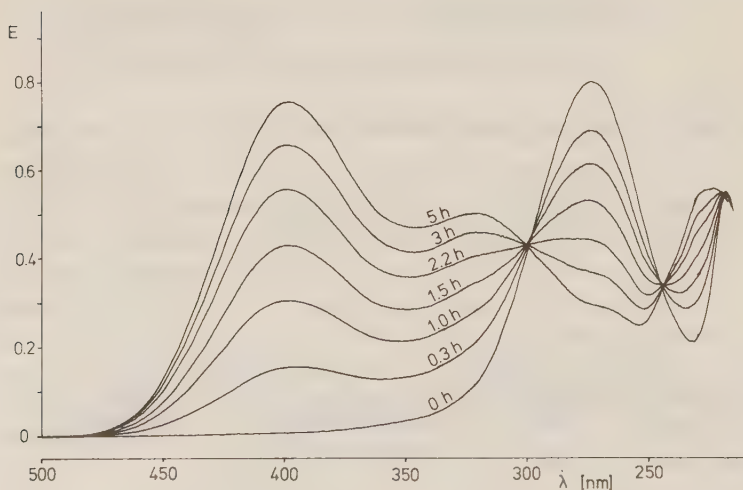


Abb. 7 Isosbestische Kurven bei der Proteinase K - katalysierten Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0, 0.2 % Acetonitril, 25°C, Substratkonzentration 80 μM .

3.5 Untersuchung der Substratanlagerungsstelle

3.5.1 Messungen mit spezifischen Substraten

3.5.1.1 N-blockierte Aminosäure-4-nitroanilide

Um unabhängig von den Untersuchungen an der Insulin B-Kette die Frage zu klären, welche Aminosäuren an das aktive Zentrum der Proteinase K angelagert werden können, wurde die Spaltbarkeit einer Reihe von Aminosäure-4-nitroaniliden untersucht. Wie Ebeling et al.⁽⁸⁾ gezeigt haben, werden an der Aminogruppe ungeschützte Verbindungen überhaupt nicht gespalten, wodurch eine aminopeptidatische Aktivität mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit an der oxidierten Insulin B-Kette ermittelten Befunden überein. Es wurden aus diesem Grunde nur an der α -Aminogruppe durch Acylierung geschützte Aminosäure-Nitroanilide untersucht (Tabelle 2).

Von diesen Verbindungen werden die Derivate des Prolins, Lysins und Arginins nicht gespalten, wie ja auch in der Insulin B-Kette an der Carboxylgruppe dieser Aminosäuren keine Proteolyse erfolgt. Bei den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin ist es wahrscheinlich die positive Ladung der ϵ -Amino- bzw. δ -Guanidiniumgruppe, die durch elektrostatische Wechselwirkungen die Anlagerung an das Enzym verhindert, da sterische Effekte wegen der vergleichbaren Größe der Seitenketten von Lysin, Arginin, Phenylalanin und Tyrosin nicht ausschlaggebend sein dürften. Beim Prolin ist es sicherlich die Fixierung der aliphatischen Seitenkette und der Aminofunktion in Gestalt eines Fünfringes, die die richtige sterische Orientierung des Substrates wegen

seiner starren, nicht an das aktive Zentrum des Enzyms adaptierbaren Struktur verhindert, da eine Rotation um die N - C α -Bindung unmöglich ist. Beim Prolin beträgt der Winkel φ der Bindungen (in Richtung der N - C α -Bindungsachse gesehen), die von N und C α ausgehend das Peptid- oder Substratrückgrat fortsetzen, -60° . Daher können prolinhaltige Substrate nur dann an das aktive Zentrum eines Enzyms gebunden werden, wenn der Winkel φ , der für eine enge Anpassung des Substrates an das Enzym nötig ist, gerade -60° beträgt.

Tabelle 2 Hydrolyse von Aminosäure-4-nitroaniliden durch Proteinase K

Substrat	$k_{cat}/K_M \left[\frac{1}{M \text{ sec}} \right]$
Acetyl-glycin-4-NA	0
Glutaryl-glycin-4-NA	0
Acetyl-L-prolin-4-NA	0
Acetyl-L-alanin-4-NA	0.21
Acetyl-L-leucin-4-NA	0.19
N α -Benzoyl-L-lysin-4-NA	0
N α -Benzoyl-L-arginin-4-NA	0
Acetyl-L-phenylalanin-4-NA	1.68
Succinyl-L-phenylalanin-4-NA	0.21
Glutaryl-L-phenylalanin-4-NA	0.083
N-Acetyl-L-tyrosin-4-NA	2.37
N.O-Diacetyl-L-tyrosin-4-NA	1.62
N-Glutaryl-L-tyrosin-4-NA	0.11
Acetyl-glycyl-L-phenylalanin-4-NA	10.4
Glutaryl-glycyl-L-phenylalanin-4-NA	13.8

Bedingungen: 0.1 M Hepes-Puffer pH 7.0, 25°C ,
5 % Dimethylformamid

Während beim Insulin B am Glycin (20) eine Hydrolyse stattfindet, werden die Glycin-nitroanilide nicht umgesetzt. Diese Tatsache beruht vermutlich auf der fehlenden Möglichkeit dieser Aminosäure, hydrophobe Wechselwirkungen mit der Substratbindungsstelle einzugehen. Diese sind aber für die Substratanlagerung wesentlich, wie die viel höhere Spaltungsgeschwindigkeit der Phenylalanin- und Tyrosinderivate im Vergleich mit denen des Alanins und Leucins zeigt.

Substrate der Form $R_2-NH-\underset{\substack{| \\ R_1}}{CH}-CO-X$ werden also besonders schnell durch Proteinase K gespalten, wenn R_1 hydrophob ist und R_2 keine negative Ladung trägt, wie dies bei der Succinyl- und Glutaryl-Schutzgruppe der Fall ist. Wenn nun R_2 eine weitere N-blockierte Aminosäure ist, so steigt die Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zur Acetylgruppe fast um eine Zehnerpotenz (Acetyl-phenylalanin-4-NA --- Acetyl-glycyl-phenylalanin-4-NA). So kann die mangelnde Hydrophobie des Glycins im Falle der Insulin B-Kette durch die Möglichkeit sekundärer Wechselwirkungen benachbarter Aminosäuren mit anderen Regionen der Enzymoberfläche kompensiert werden. Die Bedeutung nicht unmittelbar an der Spaltungsstelle gelegener Aminosäurereste des Substrates für seine Anlagerung soll genauer am Beispiel der Alanin-4-nitroanilide gezeigt werden.

3.5.1.2 Alanin-Oligopeptid-4-nitroanilide

Hierzu erscheint es sinnvoll, die Substratbindungsstelle vom katalytischen Zentrum ausgehend in eine Reihe von "subsites" $S_1, S_2, S_3 \dots S_n$ in Richtung der Aminogruppe des Substrates und $S'_1, S'_2, S'_3 \dots S'_n$ in der anderen Richtung zu unterteilen, so daß jede von ihnen mit einer Aminosäure eines Peptidsubstrates in Wechselwirkung treten kann (Abb. 8).

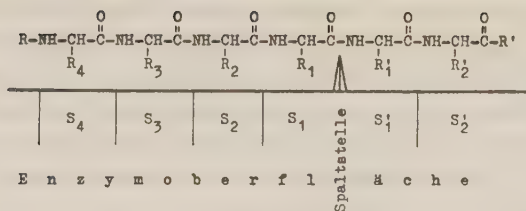


Abb. 8 Schematische Darstellung der Substratbindungsstelle und ihrer Unterteilung in mehrere subsites (nach Shechter & Berger, Lit.(32))

Die Existenz der subsites S'_1 , S'_2 ... wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Wie aus der Tabelle 3 eindeutig zu ersehen ist, nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit mit der Zahl der belegten subsites S_1 , S_2 ... S_4 um den Faktor 20 000 zu und hängt auch von der Art der gebundenen Gruppe ab:

Tabelle 3 Spaltung von L-Alanin-4-nitroaniliden durch Proteinase K

Substrat	$\frac{k_{cat}}{K_M}$ [$\frac{l}{M \cdot sec}$]	K_M [mM]	k_{cat} [sec^{-1}]	Nitro- anilin- frei- setzung
Ala-4-NA	0			
Acetyl-Ala-4-NA	0.21			
Glutaryl-Ala-4-NA	0.047			
Ala-Ala-4-NA	0			
Acetyl-Ala-Ala-4-NA	55.5			
Glutaryl-Ala-Ala-4-NA	214	6.03	1.29	
Ala-Ala-Ala-4-NA	28.5			67 %
Acetyl-Ala-Ala-Ala-4-NA	2230	1.77	3.95	32 %
Glutaryl-Ala-Ala-Ala-4-NA	4580	0.68	3.11	17 %
BOC-Ala-Ala-Ala-4-NA	-	-	-	<1 %

Bedingungen: 0.1 M HEPES-Puffer pH 7.0, 25° C
5 % Dimethylformamid

So erhöht sich beim Übergang von den Alanin- zu den Dialaninverbindungen die Spaltungsgeschwindigkeit um mehr als zwei Zehnerpotenzen. Dabei fällt auf, daß im ersten Falle die Acetylverbindung besser gespalten wird als das glutarylierte Substrat, während es bei den Dipeptidderivaten umgekehrt ist. Demnach scheint die negative Ladung der Glutarsäure-Carboxylgruppe in der S_2 -Position die Bindung des Substrates zu behindern und in der S_3 -Position zu erleichtern. Dagegen behindert die positive Ladung der unblockierten Aminogruppe in der S_1 -, S_2 - und S_3 -Position die Substratanlagerung. Diese Tatsache könnte auf eine positive Ladung an der S_3 -subsite des Enzyms hindeuten.

Der Übergang zu den Tripeptid-nitroaniliden bringt abermals eine wesentliche Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit mit sich. Bei diesen Substraten konkurrieren jedoch zwei produktive Bindungsmöglichkeiten miteinander, so daß neben Nitroanilin in beträchtlichem Umfang auch Alanin-4-nitroanilid abgespalten wird, das im Falle der BOC-Schutzgruppe zum alleinigen Produkt wird.

Hieraus lassen sich für die ersten drei subsites der Substratbindungsstelle folgende Präferenzen ableiten:

- S_1 -subsite: Hydrophobe Wechselwirkungen,
- S_2 -subsite: Hydrophobe Wechselwirkungen, schwächere Bindung positiv oder negativ geladener Gruppen,
- S_3 -subsite: Negativ geladene Gruppen werden stärker, positiv geladene Gruppen schwächer gebunden als ungeladene.

Im folgenden Abschnitt sollen nun die hydrophoben Eigenschaften der S_1 -subsite genauer untersucht werden.

3.5.2 Untersuchung der S₁-subsite der Substrat-
anlagerungsstelle mit Monocarbonsäure-
4-nitrophenylestern

Obwohl gegenwärtig die Natur hydrophober Wechselwirkungen keineswegs geklärt ist, ja bisher nicht einmal ihr direkter experimenteller Nachweis möglich war, wird ihnen für die Stabilisierung der nativen Struktur von Proteinen (33) und für die Bildung von Enzym-Substratkomplexen (34,35) erhebliche Bedeutung zugemessen. Man erklärt sie im allgemeinen dadurch, daß die Wassermoleküle in der Umgebung des hydrophoben Moleküls infolge der Ausbildung einer vom normalen, "flüssigen" Wasser verschiedenen, höher organisierten Struktur (36) einen Entropieverlust erleiden, so daß die durch Aggregation hydrophober Molekülbezirke erfolgende Verkleinerung der Phasengrenzfläche mit einem Energiegewinn des Systems verbunden ist (37).

Da offenbar auch bei der Proteinase K hydrophobe Effekte einen großen Einfluß auf die Substratanlagerung ausüben, wurde die Größe einer entsprechenden Bindungsregion anhand der Hydrolysegeschwindigkeit von Monocarbonsäure-4-nitrophenylestern mit verschiedener Alkylkette untersucht (Tabelle 4).

Tabelle 4 Spaltung von Carbonsäure-4-nitrophenyl-
estern durch Proteinase K

Carbonsäurerest des Substrates	$\frac{k_{cat}}{K_M}$ ^{a)} [M ⁻¹ sec ⁻¹]	E_s *	lg K_M ^{b)}	lg k_{cat} ^{b)}	lg $\frac{k_{cat}}{K_M}$
Essigsäure	198	0.00	3.523	-0.654	2.869
Propionsäure	1130	-0.07	3.469	+0.081	3.549
Buttersäure	3380		4.284	+0.083	4.367
Valeriansäure	1050		4.004	-0.100	3.905
Capronsäure	810		3.921	-0.106	3.815
Oenanthsäure	1700		4.398	-0.101	4.297
Caprylsäure	713		-	-	4.054
Pelargonsäure	183				
Caprinsäure	124				
Isobuttersäure	673	-0.47			
Pivalinsäure	56	-1.54			

a) 0.1 M HEPES-Puffer pH 7.0, 20 % Propanol-1, 25° C

b) 0.1 M HEPES-Puffer pH 7.0, 2,5% Acetonitril, 25° C

* E_s -Werte aus Lit.(38)

3.5.2.1 Einfluß der Kettenlänge der Carbonsäure auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Trägt man die Zahl der C-Atome der Säuren gegen die Spezifitätskonstante der Esterhydrolyse auf, so ergeben sich Maxima bei Buttersäure (C_4) und Oenanthsäure (C_7) (Abb. 9). Dies zeigt, daß sowohl Substrate mit kurzer aliphatischer Seitenkette (entsprechend Alanin) als auch solche mit längerer hydrophober Seitenkette (entsprechend Phenylalanin, Tyrosin) von Proteinase K gut gespalten werden können. Die gemessenen Maxima stimmen ausgezeichnet mit den von Marshall und Akgün bei Elastase und Chymotrypsin gefundenen überein (34), wodurch diese Deutung unterstützt wird.

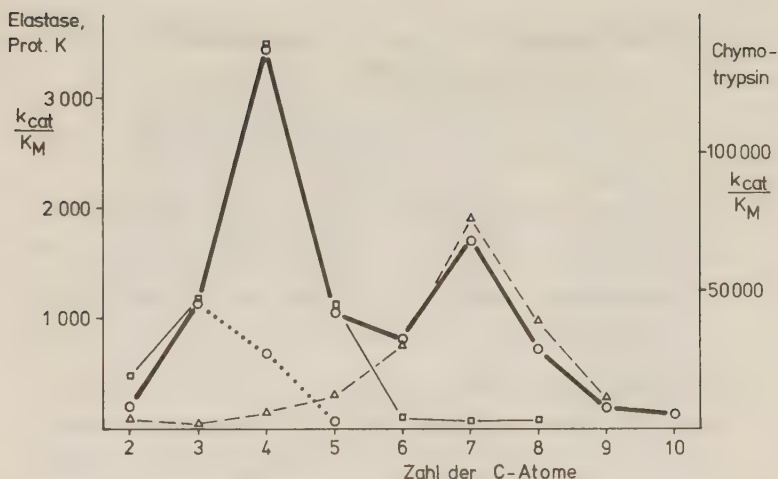


Abb. 9 Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von Carbonsäure-4-nitrophenylestern $C_nH_{2n-1}O_2-C_6H_4NO_2$ von der Kettenlänge der Carbonsäure

○——○ Proteinase K, n-Alkylkette
 ○·····○ Proteinase K, α-verzweigte Alkylkette
 □——□ Elastase
 △——△ Chymotrypsin } Werte aus Lit. (34)

So besitzt die Proteinase K eine Zwitternatur zwischen diesen beiden Pankreasenzymen, die zur Folge hat, daß sie gleichzeitig die sich ergänzenden Funktionen beider Proteasen ausüben kann. Dieses Ergebnis stimmt mit der an der oxidierten Insulin B-Kette festgestellten sehr breiten Spezifität des Enzyms überein.

3.5.2.2 Einfluß sterischer Effekte

Es ist jedoch offensichtlich, daß für die enzymatische Hydrolyse nicht nur hydrophobe Wechselwirkungen, sondern auch sterische Effekte eine wesentliche Rolle spielen. Diese Tatsache ergibt sich aus der Betrachtung

der Reihe Essigsäure < Propionsäure > Isobuttersäure > Pivalinsäure (Abb. 9, o....o), in der eine zunehmende Methylsubstitution des α -C-Atoms erfolgt. Die erste Methylgruppe am α -C-Atom erleichtert die Fixierung des Substrates an der Bindungsstelle durch Erhöhung der Hydrophobie, die zweite und dritte behindern dagegen durch sterische Effekte die Substratanlagerung. Dabei korreliert die Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit mit dem Taftschen sterischen Parameter E_s (38):

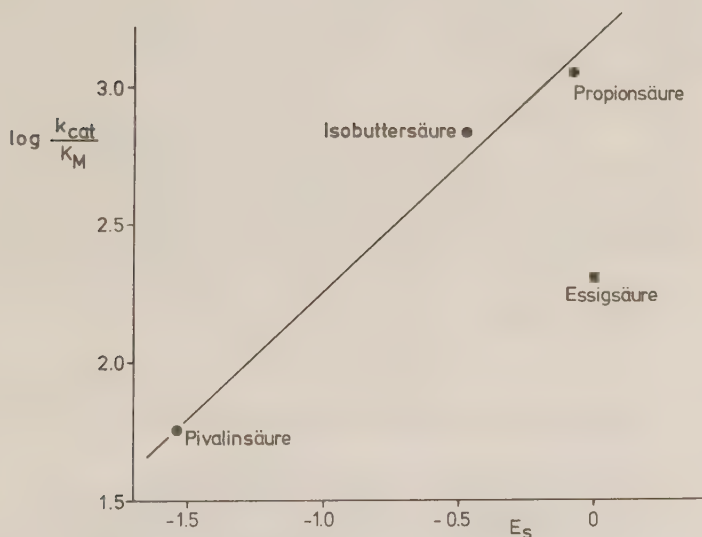


Abbildung 10 Korrelation der Spaltungsrate von α -verzweigten Carbonsäure-4-nitrophenylestern mit dem sterischen Parameter E_s ($\rho = 0.91$, $r = 0.9945$, $n = 3$, ohne Essigsäure)

3.5.2.3 Geringer Einfluß der Kettenlänge auf k_{cat}

Betrachtet man die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_M getrennt, so erkennt man, daß k_{cat} ab C_3 mit wachsender Kettenlänge nur leicht abnimmt:

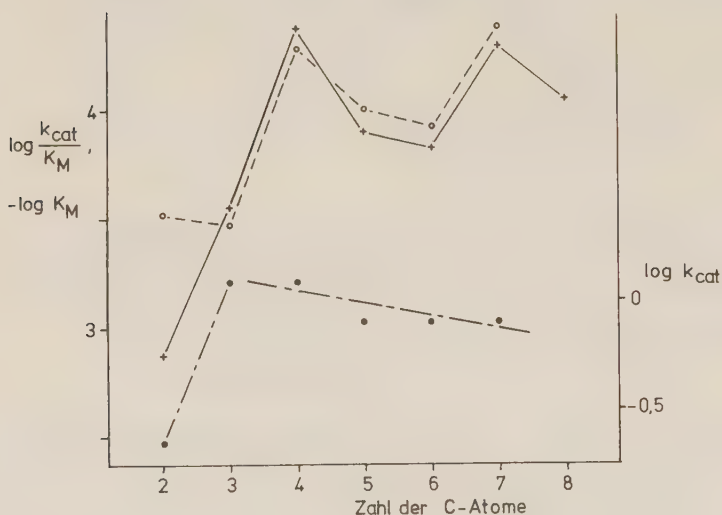


Abb. 11 Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Kettenlänge unverzweigter Carbonsäure-4-nitrophenylester

+ ——— + $\log \frac{k_{cat}}{K_M}$
 o ——— o $-\log K_M$
 • ——— • $\log k_{cat}$

Diese Tatsache ist konsistent mit dem zur Ableitung der kinetischen Gleichungen benutzten Reaktionsmechanismus (II). Wie im folgenden Kapitel 3.6 gezeigt wird, ist nach der dort aufgestellten Hypothese die Deacylierung eines intermediär gebildeten Acylenzyms der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ($k_{cat} = k_{34}$). Anders als bei der nichtenzymatischen Esterspaltung, wo der frei bewegliche Alkylrest der Säure die Reaktion sterisch behindern kann ⁽³⁹⁾, ist er im Falle der enzymatischen Hydrolyse wahrscheinlich an der Substratbindungsstelle so fixiert, daß dieses verhindert wird. Da der induktive Effekt einer Verlängerung der Alkylkette, wie an den dadurch fast unbeeinflussten Dissoziationskonstanten der Carbonsäuren zu erkennen ist, vernachlässigt werden kann, sollte k_{cat} konstant sein, die leichte Abnahme könnte durch erschwerte Abdissoziation der entstandenen Carbonsäure bei zunehmender Kettenlänge zu erklären sein.

Der niedrige Wert von k_{cat} bei 4-Nitrophenylacetat beruht offensichtlich auf nichtproduktiven Bindungsanteilen, die bei der Kleinheit der Acetylgruppe gegenüber dem aromatischen Kern nicht verwundern (Vgl. Abb. 12 d).

3.5.2.4 Die Kettenlänge beeinflusst vorwiegend die Bildung des Michaelis-Menten-Komplexes

Die beiden Maxima der Spezifitätskonstanten bei der Nitrophenylester-Hydrolyse resultieren daher aus Änderungen der Michaeliskonstanten

$$K_M = \frac{k_{34}}{k_{23} + k_{34}} K_s .$$

Da außer der Reaktivität der Substrate auch die sterische Anordnung im Übergangszustand zur Bildung des Acylenzyms durch eine Verlängerung der Alkylkette der Carbonsäure kaum beeinflusst wird, ist der Acylierungsschritt (k_{23}) ebenso wie die Deacylierung (k_{34}) von der Kettenlänge der Carbonsäure weitgehend unabhängig. Daraus folgt, daß die Maxima bei C_4 und C_7 nur auf Änderungen der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes

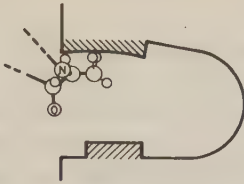
$$K_E = \frac{k_{21} + k_{23}}{k_{12}}$$

beruhen

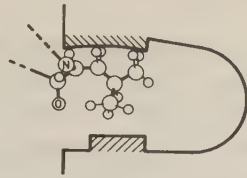
und sich auch hier nur die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} ändern, die ein Maß für die Größe der Wechselwirkungen zwischen Substrat und Substratanlagerungsstelle sind.

3.5.3 Entwicklung eines Modells für die Struktur der S_1 -subsite der Proteinase K

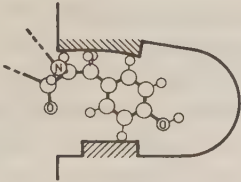
Hieraus läßt sich für die S_1 -subsite der Proteinase K eine mögliche Struktur mit zwei diskreten hydrophoben Regionen ableiten, die räumlich oder durch polare Gruppen so getrennt sind, daß kurze und lange Alkylketten, nicht aber mittelgroße (C_5 und C_6) optimal gebunden werden können. Unter der Voraussetzung, daß diese Regionen definierte Positionen einnehmen und keine induzierte Anpassung an die Substratstruktur erfolgt, läßt sich die Größe der Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse von Phenylalanin- und Tyrosinderivaten (Tabelle 2) durch die Annahme zweier einander gegenüberliegender hydrophober Bereiche interpretieren, an denen die Seitenketten aromatischer Aminosäuren gleichzeitig fixiert werden können.



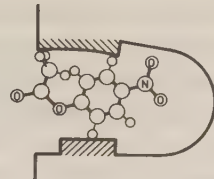
a) L-Alanin



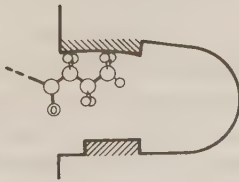
b) L-Leucin



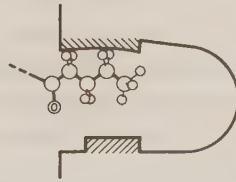
c) L-Tyrosin



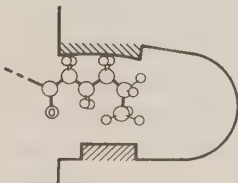
d) Unproduktive Bindung
von 4-Nitrophenylacetat



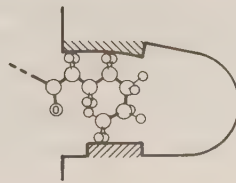
e) Buttersäure



f) Valeriansäure



g) Capronsäure



h) Oenanthsäure

Abb. 12 Bindung einiger Substrate an das
Modell der S_1 -subsite der Proteinase K

Daher wird als mögliches Modell der S_1 -subsite der Proteinase K eine Chymotrypsin-analoge hydrophobe Tasche vorgeschlagen, die sich jedoch von der des Chymotrypsins ⁽⁴⁰⁾ insbesondere dadurch unterscheidet, daß sie nicht die allein entscheidende Bindungsstelle darstellt. Anders als beim Chymotrypsin, wo in der S_1 -Position unbedingt eine hinreichend große hydrophobe Gruppe zur Bindung des Substrates nötig ist ⁽⁴¹⁾, können bei der Proteinase K mangelnde Wechselwirkungen an der S_1 -subsite - ähnlich wie bei der Protease 3 aus *Streptomyces griseus* ^(41,42) - durch solche an den übrigen subsites kompensiert werden. So ist es die Kombination der Wechselwirkungen an der S_1 -subsite und an den übrigen subsites, die die Anlagerung des Substrates bewirkt und damit den katalytischen Prozeß einleitet.

Die Bindung einiger ausgewählter Substrate an die als schraffierte Flächen markierten hydrophoben Regionen des Modells der S_1 -subsite ist in Abb. 12 zusammengefaßt. Präzisere Vorstellungen über die Architektur des aktiven Zentrums der Proteinase K werden sich wohl erst aus der Röntgenstrukturanalyse des Enzyms ergeben, an der zur Zeit gearbeitet wird (Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen). Allein durch diese Methode wird sich die Struktur des aktiven Zentrums und der Substratbindungsregion jedoch auch nicht aufklären lassen, sondern man wird hierzu noch weitere Informationen aus Substrat- und Inhibitorbindungsexperimenten benötigen.

3.6 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

3.6.1 Messung der Spaltungsgeschwindigkeit ringsubstituierter Phenylacetate

Um den Einfluß der austretenden Gruppe auf die Spaltbarkeit von Substraten zu untersuchen und damit Informationen über den Katalysemechanismus zu gewinnen, wurden für eine Reihe von verschiedenen ringsubstituierten Phenylacetaten die kinetischen Konstanten bestimmt (Tabelle 5).

3.6.1.1 Unabhängigkeit von k_{cat} von der Ringsubstitution

Dabei ergab sich für k_{cat} ein praktisch vom Substitutionsmuster des Benzolringes unabhängiger Wert. Diese Tatsache ist konsistent mit der Annahme, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion erst nach der Abspaltung des Phenols erfolgt und im Zerfall eines für alle Phenylacetate identischen Intermediärproduktes besteht.

Hierfür käme nach den heutigen Vorstellungen lediglich ein Acylenzym in Frage, dessen Existenz bei vielen Proteasen eindeutig bewiesen ist (23-27) und dessen Bildung möglicherweise auch im Verlauf der durch die Proteinase K katalysierten Reaktionen eine zentrale Rolle spielt.

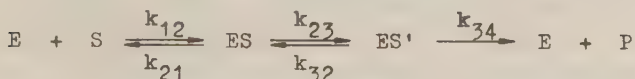
Eine andere mögliche Erklärung für die Konstanz von k_{cat} wäre z. B. eine geschwindigkeitsbestimmende obligatorische Konformationsänderung des Enzyms während

Tabelle 5 Physikalische und kinetische Parameter der gemessenen Phenylacetate

Substi- tuent	Wellen- länge [nm]	Extinktions- koeffizient	$\pi^{(43)}$	$G^{(44)}$	$pK_a^{(45)}$	$-\log K_M$	$\log k_{cat}$	$\log \frac{k_{cat}}{K_M}$
—	270	1.38×10^3	0.00	0.00	9.95	2.398	-0.734	1.664
4-Fluor	278	1.94×10^3	0.31	0.062	9.95	2.469	-0.860	1.608
4-Chlor	280	1.60×10^3	0.93	0.227	9.38	2.721	-0.806	1.915
4-Brom	280	1.35×10^3	1.13	0.232	9.34	3.051	-0.775	2.276
4-Methyl	280	1.38×10^3	0.48	-0.17	10.19	2.469	-0.605	1.864
4-Methoxy	288	2.49×10^3	-0.12	-0.268	10.20	2.190	-0.744	1.447
4-Acetyl	325	2.96×10^3	-0.11	0.502	8.05	3.334	-0.841	2.494
4-Carboxyl	270	2.57×10^3	0.12	0.45	9.39	2.824	-0.126	2.698
4-Nitro	405	10×10^3	0.50	0.778	7.14	3.553	-0.778	2.775
3-Fluor	272	1.15×10^3	0.47	0.337	9.28	2.357	-0.695	1.662
3-Chlor	280	0.85×10^3	1.04	0.373	9.02	2.420	-0.886	1.534
3-Brom	280	1.48×10^3	1.17	0.391	9.11	2.432	-0.806	1.626
3-Methyl	276	1.33×10^3	0.56	-0.069	10.08	1.951	-0.561	1.390
3-Acetyl	310	2.04×10^3	-0.07	0.316	9.19	2.201	-0.734	1.467
3-Nitro	355	1.25×10^3	0.54	0.71	8.35	3.398	-0.755	2.643

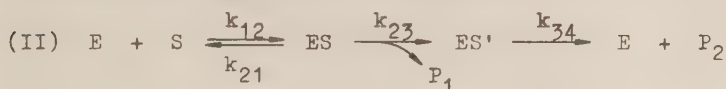
Bedingungen: 0.1 M HEPES-Puffer pH 7.0, 2.5 % Dimethylformamid, 25° C

der Reaktion, die durch Strukturänderungen des Substrates nicht beeinflußt wird. Selbst ein diffusionskontrollierter Reaktionsschritt kann geschwindigkeitsbestimmend sein, wenn die Stationärkonzentration des entsprechenden Intermediärkomplexes gering ist, etwa nach folgendem Schema:



k_{34} sei diffusionskontrolliert; wenn $k_{23} \ll k_{32}$, ist k_{34} geschwindigkeitsbestimmend.

Nimmt man nun als wahrscheinlichste Erklärung für den konstanten Wert von k_{cat} einen Acylenzym-Mechanismus mit geschwindigkeitsbestimmender Deacylierung an, so ergeben sich für die einzelnen Schritte des zur Ableitung der kinetischen Gleichungen benutzten Reaktionsmechanismus (II) folgende Bedeutungen:



ES : adsorptiver Michaelis-Menten-Komplex

ES' : Acylenzym

P_1 : austretende Gruppe (hier Phenol)

P_2 : Acylrest (hier Essigsäure)

k_{12} : Adsorptionsschritt

k_{21} : Desorptionsschritt

k_{23} : Acylierungsschritt

k_{34} : Deacylierungsschritt

Da das an der Bruttoreaktion beteiligte Wasser selbst bei den höchsten experimentell zugänglichen Substratkonzentrationen in etwa 5000 fachem Überschuß vorliegt und sich seine Konzentration daher nicht meßbar ändert, wurde es der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

3.6.1.2 Hammett - Analyse

Der Einfluß der Ringsubstitution beschränkt sich also auf die Reaktionsschritte k_{12} , k_{21} und k_{23} und wurde zunächst mit Hilfe der Hammett'schen σ -Werte untersucht (Abb. 13 und 14). Dabei ergab sich tatsächlich für k_{cat} eine fast σ -unabhängige Korrelationsgerade, deren geringe Neigung im Vergleich zur Streuung der Meßpunkte ($r = 0.4293$) als völlig insignifikant vernachlässigt werden kann:

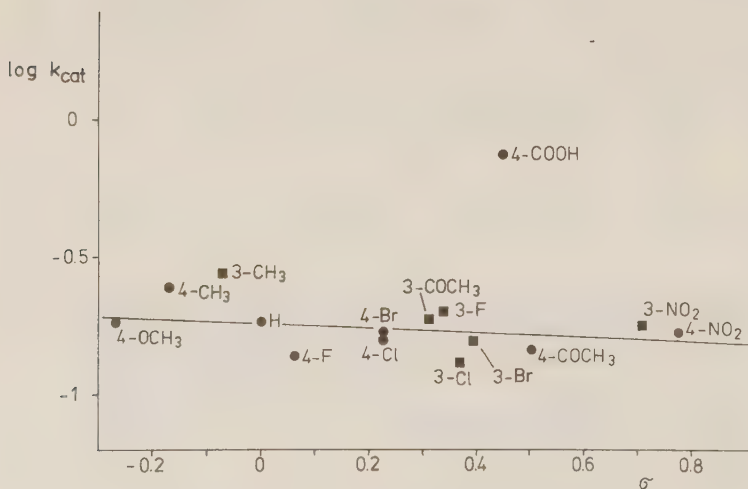


Abb. 13 Fast völlige Unabhängigkeit von k_{cat} vom σ -Wert des Ringsubstituenten ($\rho = -0.12$, $r = 0.4293$, $n = 15$)

3.6.1.2.1 Einfluß der Ringsubstitution auf die Michaeliskonstante K_M

Bei der Untersuchung des Substituenteneinflusses auf die Michaeliskonstante zeigt sich für die $-\log K_M$ -Werte eine lineare Abhängigkeit von den Hammett'schen σ -Werten. (Abb. 14)

Diese ist jedoch für die 3- und 4-Substituenten verschieden, so daß sich zwei Korrelationsgeraden mit verschiedenen Achsenabschnitten ergeben. Dabei läßt sich die 3-Nitroverbindung zu den 4-Substituenten einordnen:

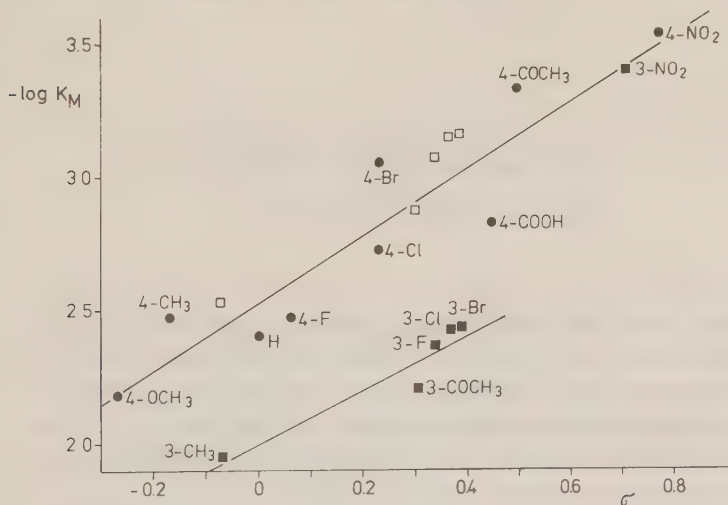


Abb. 14 Abhängigkeit der Michaeliskonstanten vom σ -Wert der Ringsubstituenten

- 4-Substituenten: $\rho = 1.26$
 $r = 0.9294$
 $n = 9$
- 3-Substituenten ohne NO₂: $\rho = 0.997$
 $r = 0.945$
 $n = 5$
- 3-Substituenten nach Korrektur
 (siehe Text)

Bei Untersuchungen an der Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4) aus Rattenlebermitochondrien ist die geringere Inhibitorwirkung von 3-, 3.4- und 3.5-substituierten N-(Phenoxyäthyl)cyclopropylaminen auf sterische Hinderung der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung zurückgeführt worden ⁽⁴⁶⁾. Um die sterisch gehinderten Verbindungen trotzdem in Regressionsrechnungen mit einbeziehen zu können, wurden für sie empirische Korrekturfaktoren angewendet, und zwar für einen 3-Substituenten der Wert $\gamma = 1.3$. Bei Übernahme dieses empirischen Korrekturfaktors ergibt sich für alle Substituenten (mit Ausnahme der 3-Nitroverbindung) eine gemeinsame Korrelationsgerade, die fast mit der der 4-Substituenten identisch ist (Abb. 14, ● und □, $\rho = 1.29$, $r = 0.9293$, $n = 14$)

3.6.1.2.2 Einfluß der Ringsubstitution auf die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M

Um jedoch die Unsicherheiten zu vermeiden, die die Anwendung solcher Korrekturen gerade in komplexen Enzymsystemen mit sich bringt, wurden für die endgültige Auswertung nur die 4-substituierten Verbindungen berücksichtigt. Aus den in den Abschnitten 3.2 und 3.3 dargestellten Gründen wurde die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M als Korrelationsgröße benutzt (Abb. 15).

Dabei ergab sich eine Regressionsgerade mit der Steigung $\rho = 1.33$ ($r = 0.9108$, $n = 9$). Elektronenziehende Substituenten begünstigen also die enzymatisch katalysierte Hydrolyse, wie es für einen nucleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des Substrates zu erwarten ist.

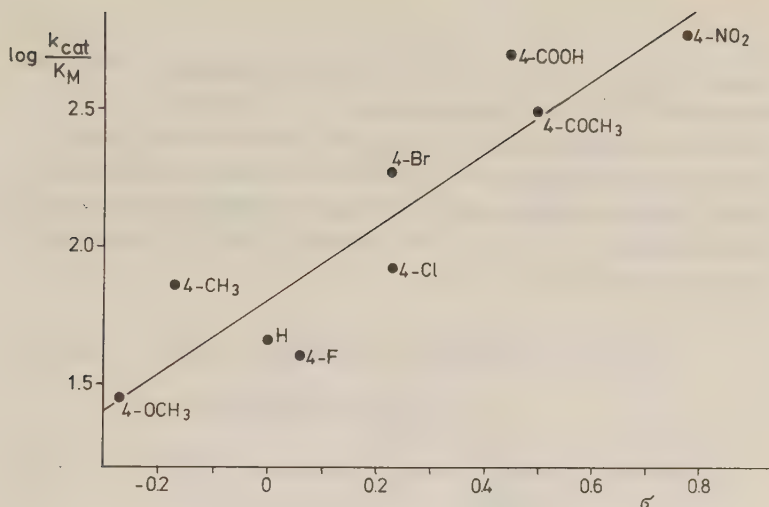


Abb. 15 Hammett-Analyse der Spezifitätskonstanten für die Hydrolyse 4-substituierter Phenylacetate ($\rho = 1.33$, $r = 0.9108$, $n = 9$)

3.6.1.2.3 Vergleich mit anderen Reaktionen

Wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, steigt ρ für die basenkatalysierte Hydrolyse von Phenylacetaten bei schwächeren Basen als OH^- fast auf das Doppelte an:

Katalysator	ρ
OH^- (47)	1.1
NH_3 (47)	1.81
Imidazol (47)	1.9
α -Chymotrypsin (48)	1.8 (Acylierung)
Subtilisin Carlsberg (49)	1.14
Proteinase K	1.33

Diese Tatsache steht im Einklang mit Hammonds Postulat (50), daß für Reaktionen mit niedrigerer Aktivierungsenergie der Übergangszustand früher auf der Reaktionskoordinaten liegt als bei solchen mit höherer Aktivierungsenergie, so daß bei wirksameren Katalysatoren der Substituenteneinfluß auf die Aktivierungsenergie geringer ist:

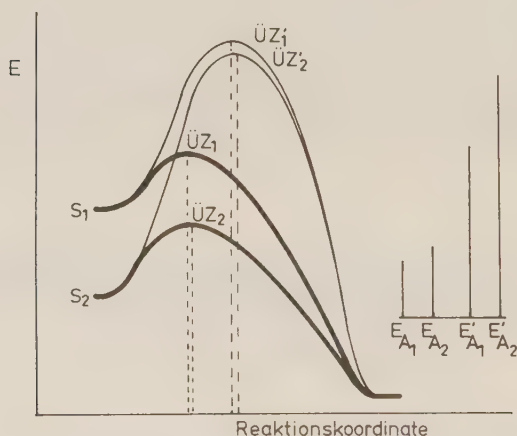


Abb. 16 Verhältnis der Aktivierungsenergien E_A bei der Spaltung zweier Verbindungen S_1 und S_2 durch einen wirksamen (E_{A_1} , E_{A_2}) und einen weniger wirksamen Katalysator (E'_{A_1} , E'_{A_2}) mit den Übergangszuständen $\ddot{U}Z_1$ und $\ddot{U}Z_2$ beziehungsweise $\ddot{U}Z'_1$ und $\ddot{U}Z'_2$

Für die Subtilisin-katalysierte Spaltung von Phenylacetaten wird aufgrund des niedrigen ρ -Wertes im Übergangszustand eine Stabilisierung der austretenden Phenoxy-Gruppe durch eine elektrophile Gruppierung am Enzym oder durch nucleophile Assistenz am Carbonyl-

Sauerstoff im Grundzustand oder durch beide Arten von Wechselwirkungen angenommen (49).

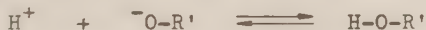
Die bei der Proteinase K erhaltenen Befunde sprechen gleichfalls für die Stabilisierung des Übergangszustandes durch ein an der Katalyse beteiligtes enzym-genuines Elektrophil, wie sich durch Brønsted-Analyse zeigen läßt.

3.6.1.3 Brønsted-Analyse und Folgerungen für den Übergangszustand

Hierbei wird die Ladungstrennung im Übergangszustand der katalysierten Reaktion (N : Nucleophil)



mit der Protonierungsreaktion der austretenden Gruppe



verglichen, bei der ja eine vollständige Ladungstrennung erfolgt (51).

Die Korrelationsanalyse der Spezifitätskonstanten der Phenylacetat-Hydrolyse mit der Dissoziationskonstanten der austretenden Gruppe ergibt eine Steigung der Regressionsgeraden von $\beta = 0.39$ ($r = 0.9285$, $n = 8$) (Abb. 17). Das bedeutet, daß die Substituenteneinflüsse auf die freie Energie des Übergangszustandes 0.39 mal so groß sind wie auf die freie Energie der Protonierungsreaktion, daß sich die Reaktion also so verhält, als ob im Übergangszustand statt der Ladung 1 lediglich die Teilladung 0.39 auftritt. Diese relativ geringe Ladungstrennung ist z. B. durch partielle Protonierung des Äthersauerstoffs erklärbar, so daß sich für den Übergangszustand die in Abb. 18 gezeigte hypothetische Formulierung ergibt.

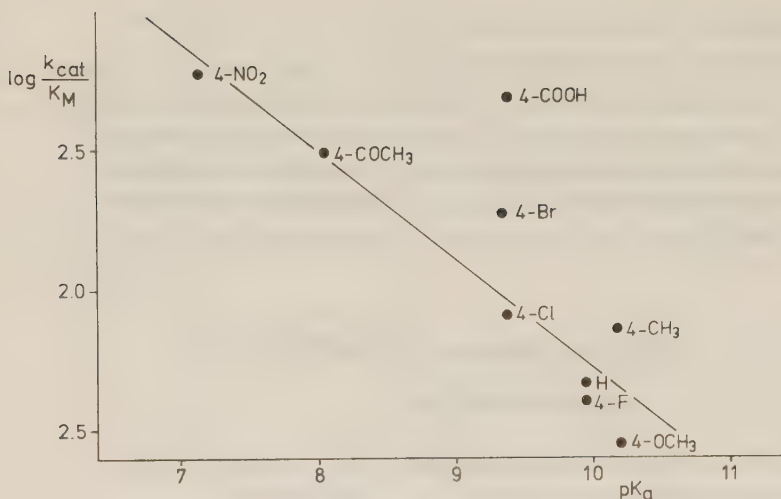


Abb. 17 Korrelation der Spezifitätskonstanten der Proteinase K -katalysierten Hydrolyse von Phenylacetaten mit der Basizität der austretenden Gruppe:
 ohne 4-COOH: $\beta = 0.39$, $r = 0.9238$, $n = 8$
 mit 4-COOH: $\beta = 0.38$, $r = 0.803$, $n = 9$

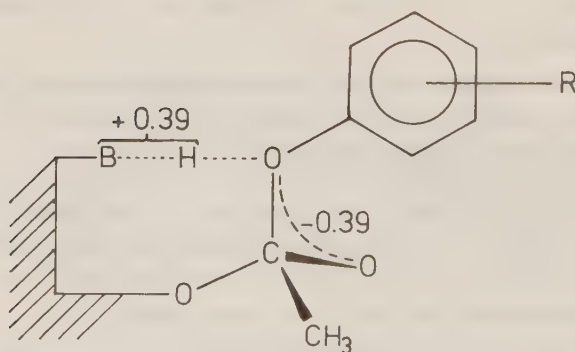


Abb. 18 Möglicher Übergangszustand für die Proteinase K -katalysierte Hydrolyse von Phenylacetaten

3.6.1.4 Hydrophobe Effekte der austretenden Gruppe

Der Einfluß des hydrophoben Charakters der austretenden Gruppe auf die kinetischen Konstanten ergab keine Anhaltspunkte für ihre hydrophobe Fixierung am Enzym.

Als geeignete Parameter für die Messung der Hydrophobieeigenschaften anhand einer empirischen Skala haben sich die von Hansch eingeführten π -Werte erwiesen⁽⁴³⁾, die aus den Verteilungskoeffizienten P der kongenesischen Verbindungen in dem System n -Octanol/Wasser analog zu den Hammett'schen σ -Werten nach der Formel $\pi = \log P_X - \log P_H$ berechnet werden. (X und H bezeichnen die substituierte bzw. die Stamm-Verbindung.)

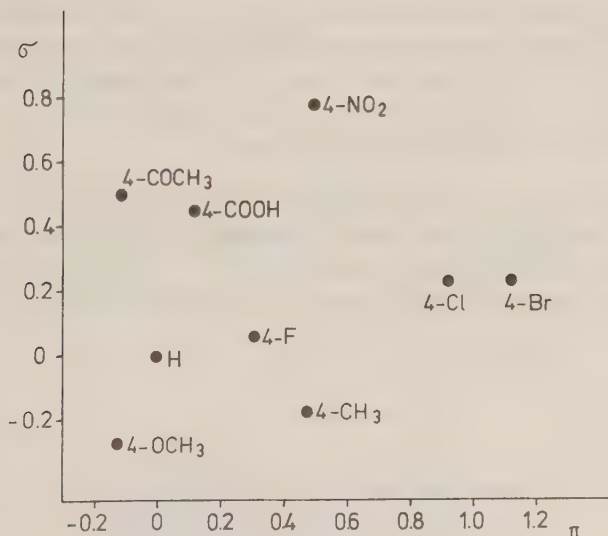


Abb. 19 Interkorrelation der π - und σ -Werte der gemessenen Verbindungen

Um bei der Untersuchung von Substituenteneinflüssen elektronische und hydrophobe Effekte trennen zu können, sind grundsätzlich Substituenten auszuwählen, bei denen die extrathermodynamischen π - und σ -Werte nicht interkorreliert sind ⁽⁵²⁾. Das trifft bei den hier verwendeten Verbindungen zu, wie Abb. 19 zeigt.

Die Korrelationsanalyse der kinetischen Konstanten der 4-substituierten Phenylacetate mit der Hydrophobie der austretenden Gruppe ergibt für k_{cat} wegen der Substituentenunabhängigkeit dieses Parameters eine waagrechte Ausgleichsgerade (Abb. 20).

Bei der Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M scheint eine Korrelation für sechs der gemessenen Verbindungen (schräg aufsteigende Reihe von 4-OCH₃ bis 4-Br) zu bestehen, die jedoch, wie Abb. 19 zeigt, auf eine partielle Interkorrelation von π und σ zurückgeführt werden kann. Berücksichtigt man alle neun gemessenen Punkte, so ist festzustellen, daß hydrophobe Eigenschaften der austretenden Gruppe offensichtlich für die Katalyse keine Rolle spielen.

Daher ist die Existenz einer hydrophoben Bindungsstelle für die austretende Gruppe, wie sie beim Subtilisin Carlsberg angenommen wird ⁽⁴⁹⁾, bei der Proteinase K nach den vorliegenden Befunden auszuschließen.

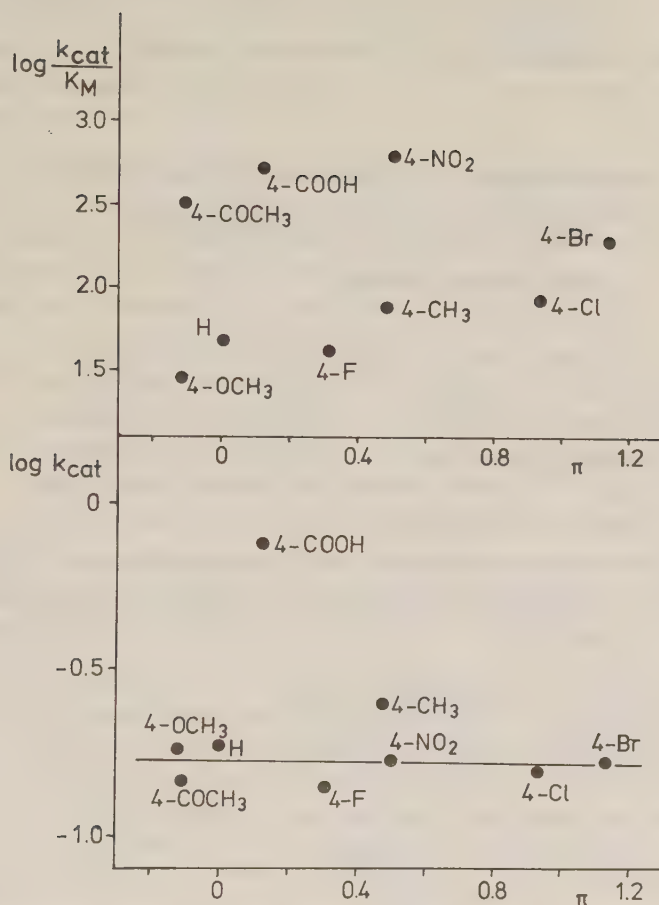


Abb. 20 Auftragung der kinetischen Konstanten gegen die Hydrophobie der austretenden Gruppe

3.6.2 Hinweise auf die Beteiligung einer Histidin-
Seitenkette am Katalysemechanismus

3.6.2.1 Messung der pH-Abhängigkeit der Spaltung
von Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenyl-
alanin-4-nitroanilid

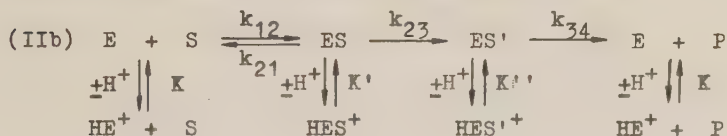
Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen wurde bereits vor mehr als 60 Jahren erkannt und auf Dissoziationsgleichgewichte ionisierbarer Gruppen zurückgeführt ⁽⁵³⁾. Diese können die Reaktionsgeschwindigkeit auf verschiedene Weise beeinflussen:

- 1) Änderung des Ladungszustandes des Substrates
- 2) Reversible oder irreversible Änderung der Proteinkonformation
- 3) Ist die dissoziierende Gruppe Teil des aktiven Zentrums des Enzyms, kann sie entweder die Substratbindung oder die Transkonformation des Enzym-Substrat-Komplexes oder beide beeinflussen. So ist auch ein pH-abhängiger Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschrittes denkbar.

Im vorliegenden Fall können Einflüsse, die von Ladungsänderungen des Substrates herrühren, ausgeschlossen werden, da im pH-Bereich unter pH 5,5, wo die Dissoziation der verwendeten Glutaryl-Aminoschutzgruppe abnimmt, die pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter linear verläuft. Eine pH-bedingte Denaturierung findet in dem untersuchten Bereich während der kurzen Zeit

der Messung, wie durch Inkubationsversuche festgestellt wurde, nicht statt. Dagegen ist eine durch Ladungsänderungen induzierte reversible Konformationsänderung des Enzyms durchaus möglich, aber genau so schwierig zu beweisen wie auszuschließen.

Die pH-Abhängigkeit der Proteinase K-katalysierten Spaltung des Substrates Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid läßt sich in dem untersuchten Bereich durch eine einfache Erweiterung des Reaktionsschemas (II) hinreichend beschreiben ⁽⁵⁴⁾:



In diesem Modell wird vorausgesetzt, daß nur die deprotonierte Enzymform an der Reaktion beteiligt ist. Dann ergibt sich für die kinetischen Konstanten analog zu den Gleichungen (V), (VI) und (VII)

$$\text{(Va)} \quad k_{\text{cat}} = \frac{k_{23} \quad k_{34}}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}''}\right) k_{23} + \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}'}\right) k_{34}}$$

$$\text{(VIa)} \quad K_M = \frac{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}}\right) k_{34} \quad (k_{21} + k_{23})}{k_{12} \left[\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}''}\right) k_{23} + \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}'}\right) k_{34} \right]}$$

$$\text{(VIIa)} \quad \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{k_{12} \quad k_{23}}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}}\right) k_{21} + k_{23}}$$

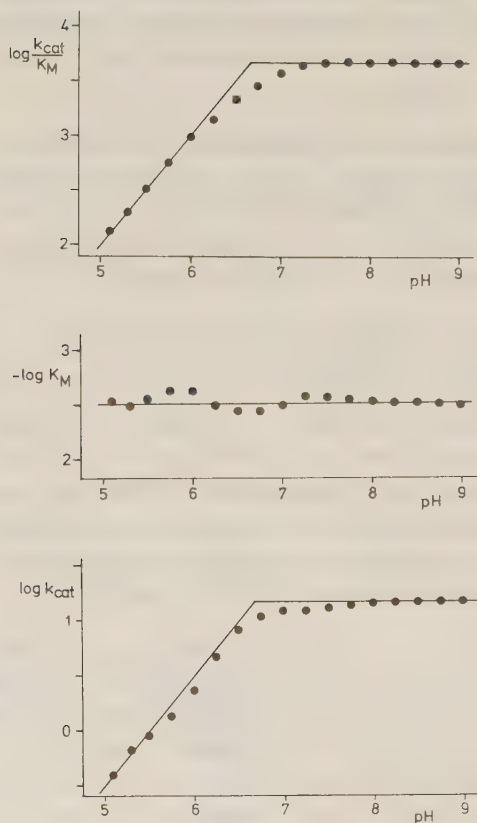


Abb. 21 pH-Abhängigkeit der Proteinase K -
 katalysierten Spaltung von Glutaryl-
 L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid
 in Universalpuffer $\mu = 0.3$ M, 5 % Dimethyl-
 formamid, 25° C

Wie aus Abb. 21 zu ersehen ist, sind sowohl die maximale Umsatzgeschwindigkeit k_{cat} als auch die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M linear vom Dissoziationszustand einer - und wie die Steigung der Kurve beweist, nur einer - ionisierbaren Gruppe mit dem pK 6.67 abhängig, während K_M praktisch unverändert bleibt.

Aus der Konstanz von K_M folgt unmittelbar (Gleichung VIa):

Für $k_{23} \cong k_{34}$ gilt: $K' = K'' = K$

für $k_{23} \ll k_{34}$ gilt: $K' = K$

für $k_{23} \gg k_{34}$ gilt: $K'' = K$

Das heißt, daß der pK der ionisierbaren Gruppe in dem Enzym-Substrat-Komplex, der dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vorausgeht (ES für $k_{cat} = k_{23}$, ES' für $k_{cat} = k_{34}$), genau so groß ist wie im freien Enzym.

Diese Gleichheit des pK ist für den Fall, daß die ionisierbare Gruppe Teil des aktiven Zentrums ist, wohl eher für den adsorptiven Michaelis-Menten-Komplex ES wahrscheinlich als für den kovalenten Komplex ES', in dem das Substrat bereits mit den katalytischen Gruppierungen des aktiven Zentrums in Wechselwirkung getreten ist und dadurch ihre Elektronenverteilung beeinflußt hat. Hieraus läßt sich schließen, daß bei der Proteinase K, wie z. B. im Falle des Chymotrypsins oder der Protease 3 aus *Streptomyces griseus*, bei der Spaltung von Aminosäureamiden und -aniliden die Acylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (19,55-57).

Als ionisierbare Gruppe mit einem pK von 6.67 könnte die Imidazolgruppe eines Histidinrestes in Frage kommen, die ja im Katalysemechanismus sehr vieler Enzyme eine bedeutende Rolle spielt (58), wobei ihre Funktion bei den Serin-Proteasen, z. B. Chymotrypsin und Trypsin eingehend untersucht worden ist (21,30).

3.6.2.2 Diskussion eines möglichen kooperativen Reaktionsmechanismus

Ähnlich wie bei diesen Enzymen ist daher bei der Proteinase K ein kooperativer Katalysemechanismus, an dem Serin und Histidin beteiligt sind, möglich (Abb. 22). Acylierung und Deacylierung der Serin-Seitenkette werden vom Imidazol-Kern des Histidins durch allgemeine Basenkatalyse (Bildung des tetraedrischen Übergangszustandes, vgl. 3.6.1.3) und allgemeine Säurekatalyse (Protonierung der austretenden Gruppe) erleichtert.

Aus diesem Reaktionsmechanismus wird auch klar, daß der Katalysevorgang in saurem Medium nicht ablaufen kann, da dann der Imidazolring in der protonierten Form vorliegt und daher nicht als Base wirken kann.

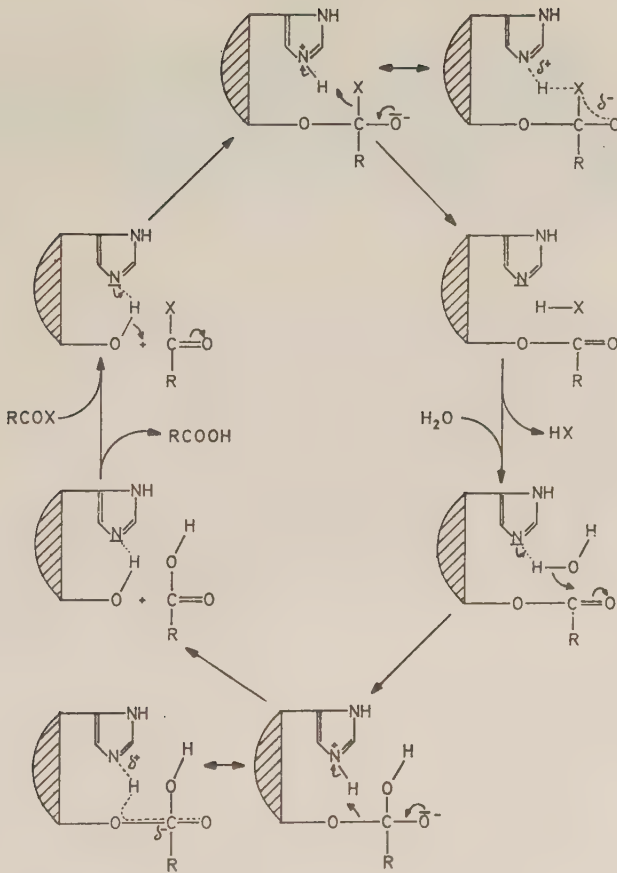


Abb. 22 Möglicher kooperativer Reaktionsmechanismus für die Proteinase K -katalysierte Hydrolyse von Substraten

3.6.2.3 Hemmung der Proteinase K durch

Diäthylpyrocarbonat

Möglicherweise ist auch die teilweise und reversible Inaktivierbarkeit der Proteinase K durch Diäthylpyrocarbonat (59) auf die Modifizierung eines an der Katalyse beteiligten Histidinrestes zurückzuführen:

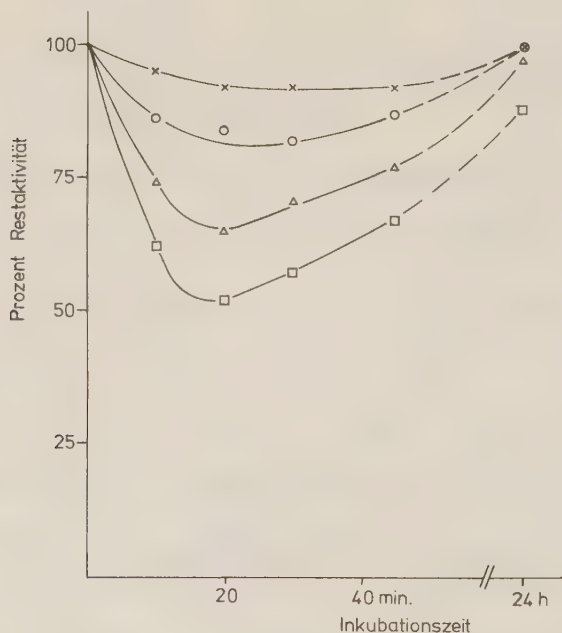


Abb. 23 Inaktivierung der Proteinase K durch Diäthylpyrocarbonat in 60 mM Natriumcitratpuffer pH 6.0

- x Äquimolare Menge Reagens
- O 5-facher Überschuß Reagens
- Δ 25-facher Überschuß Reagens
- 125-facher Überschuß Reagens

Aktivitätstest: 10 mM 4-Nitrophenylacetat
in 0.1 M Hepes-Puffer pH 7.0,
2.5 % Acetonitril, 25° C.

Jedenfalls läßt sich bei der Inkubation die Bildung von Carbäthoxyhistidin spektroskopisch nachweisen. Da Diäthylpyrocarbonat aber auch unspezifisch mit anderen nucleophilen Gruppen an Enzymen reagieren kann (60), deren Modifizierung spektroskopisch nicht nachweisbar ist, kann auf diese Weise die Existenz einer essentiellen Histidin-Seitenkette nicht bewiesen werden.

Eine solche Identifizierung der am Katalysemechanismus beteiligten Gruppen ist nur durch irreversible Modifizierung möglich, da nur dann die modifizierten Aminosäuren nach den Verfahren der Peptidchemie isoliert und identifiziert werden können. Aber auch diese Methode ist nur dann schlüssig, wenn sichergestellt werden kann, daß nicht lediglich die Struktur des aktiven Zentrums durch die Modifizierung einer gar nicht am Katalysemechanismus beteiligten Gruppierung verzerrt wird.

4 Zusammenfassung

- 1) Die Untersuchung der Spaltungsspezifität der Proteinase K gegenüber der oxidierten Insulin B-Kette zeigt, daß dieses Enzym bevorzugt Peptidbindungen zwischen Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten spaltet, bei längerer Inkubationszeit aber auch an polaren Aminosäuren angreift. Die so ermittelte Spezifität ist fast identisch mit der der Subtilisine.
- 2) Proteinase K besitzt im Vergleich zu den Säuger-Serinproteasen eine ausgedehnte Substratbindungsregion, die sich über mindestens drei Peptidbindungen erstreckt und in diskrete "subsites" unterteilbar ist.
- 3) Ein Modell für die S_1 -subsite, an der die Substratfixierung durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt, wird vorgeschlagen.
- 4) Die Proteinase K -katalysierte Hydrolyse von Phenylacetaten ist mit einem Acylenzym-Mechanismus konsistent, bei dem die Deacylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.
- 5) Elektronenziehende Substituenten am aromatischen Kern der Phenylacetate begünstigen die Hydrolyse, dabei wird die Aktivierungsenergie zur Bildung des hypothetischen Acylenzyms durch partielle Protonierung der austretenden Gruppe im Übergangszustand verringert.
- 6) Die austretende Gruppe von Phenylacetaten wird nicht durch hydrophobe Effekte an das Enzym gebunden.
- 7) An der enzymatischen Hydrolyse des Substrates Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid ist eine ionisierbare Gruppe mit dem pK 6.67, möglicherweise Histidin, beteiligt.
- 8) Ein möglicher Reaktionsmechanismus, bei dem Serin und Histidin kooperativ die Katalyse bewirken, wird zur Diskussion gestellt.

5 Material und Methoden

5.1 Material

Proteinase K (EC 3.4.21.?): Das für die vorliegende Arbeit verwendete Enzym wurde freundlicherweise von der Fa. E. Merck, Darmstadt, zur Verfügung gestellt. Dieses Enzympräparat war disk-elektrophoretisch rein und enthielt keine exopeptidatischen Fremdaktivitäten, da es weder L-Alanin-4-nitroanilid noch Hippuryl-L-lysin oder Hippuryl-L-phenylalanin hydrolysierte.

Subtilisin Carlsberg (EC 3.4.21.14) wurde von der Fa. Novo Pharmaceutical Co., Kopenhagen, bezogen, substituierte Phenole und Diäthylpyrocarbonat von der Fa. Fluka, Buchs. Hepes (N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure) wurde von der Fa. Serva, Heidelberg, geliefert.

Nach der Methode von Fittkau⁽⁶¹⁾ gewonnene oxidierte Rinderinsulin B-Kette wurde mir von Herrn Dr. H. Kiltz überlassen, Monocarbonsäure-4-nitrophenylester verschiedener Kettenlänge (synthetisiert nach⁽⁶²⁾) von Herrn Dr. U. Femfert.

Folgende Substrate und Aminosäurederivate (bei optisch aktiven Verbindungen stets die L-Form) wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen:

4-Nitrophenylacetat	Acetyl-alanin-4-NA
Glycin-4-NA	Acetyl-Leucin-4-NA
Prolin-4-NA	Acetyl-Tyrosin-4-NA
Alanin-4-NA	Succinyl-phenylalanin-4-NA
Phenylalanin-4-NA	Glutaryl-phenylalanin-4-NA
Tyrosin-4-NA	N ^ε -Benzoyl-lysin-4-NA
Alanin-alanin-4-NA	N ^ε -Benzoyl-arginin-4-NA
Glycyl-phenylalanin-4-NA	BOC-alanin

Die übrigen verwendeten Substrate wurden nach den unter 5.3 angegebenen Verfahren synthetisiert.

Alle weiteren Reagentien waren analytisch reine, käufliche Präparate.

Für chromatographische Trennungen wurden Kieselgel-Fertigplatten Sil G 25 und Chromatographiepapiere MN 2214 FF der Fa. Macherey & Nagel, Düren, benutzt.

5.2 Methoden zur Untersuchung der Spaltungsspezifität an der oxidierten Insulin B-Kette

Oxidierte Rinderinsulin B-Kette wurde vor der Verwendung durch Gelchromatographie an Sephadex G 50 F gereinigt und die Reinheit des Peptids durch eine Aminosäureanalyse geprüft.

5.2.1 Verdauungsansätze

Alle Verdauungen wurden in 0.05 M N-Äthylmorpholinacetat-Puffer pH 8.0 bei 25°C und Substratkonzentrationen von 3 mg/ml durchgeführt. Die berechnete Menge einer Proteinase K-Lösung in demselben Puffer wurde zugegeben und nach Ablauf der Inkubationszeit die Reaktion durch fünfzehnminütiges Erwärmen auf 100°C gestoppt. Die angegebenen Enzym/Substrat-Verhältnisse beziehen sich auf das Gewicht der Einwaagen.

5.2.1.1 Verdauung 1 : 100, 6 Stunden, Vergleich mit Subtilisin Carlsberg

Je 2 mg Insulin B wurden mit Proteinase K bzw. Subtilisin Carlsberg inkubiert. Nach Lyophilisation wurden die Verdauungsansätze direkt auf den Aminosäure-Analysator aufgegeben und nach dem normalen Aminosäure-Analysenprogramm eluiert.

5.2.1.2 Verdauung 1 : 5000, 2 Stunden

3.5 mg Insulin B wurden mit Proteinase K inkubiert und anschließend gefriergetrocknet. Nach Lösen in 30 %iger Essigsäure wurden die entstandenen Peptide durch präparative Dünnschichtchromatographie (Fließmittel a) getrennt und als Phe(1) -- Leu(15) und Tyr(16) -- Ala(30) identifiziert. Die Abwesenheit unverdauter Insulin B-Kette war durch die R_F -Werte der gefundenen Peptide sowie deren Anfärbung mit Pauly-Reagens erkennbar.

5.2.1.3 Verdauungen 1 : 1750, 2 Stunden, mit

25 mg Insulin B und

1 : 100, 6 Stunden, mit 70 mg Insulin B

Der lyophilisierte Verdauungsansatz wurde einer Kationenaustauscherchromatographie an Dowex 50 x 4 unterworfen, um die entstandenen Peptide voneinander zu trennen. Nach dem Säulenlauf wurden anhand des durch den manuellen Ninhydrin-Test erhaltenen Elutionsdiagrammes die entsprechenden Fraktionen vereinigt und gefriergetrocknet. Die Einheitlichkeit der Lyophilisate wurde durch Dünnschichtchromatographie (Fließmittel siehe 5.2.2) geprüft. Inhomogene Fraktionen wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie oder Papierchromatographie weiter aufgetrennt und danach identifiziert.

5.2.2 Präparative Dünnschichtchromatographie und Papierchromatographie

Die für präparative Zwecke vorgesehenen Chromatographieplatten wurden durchlaufchromatographisch mit 6 %iger Pyridinlösung, dann mit 1,5 %iger Ameisensäure und schließlich wieder mit 6 %igem Pyridin gereinigt. Dann wurden die Platten eine Stunde bei 110° C getrocknet und staubfrei aufbewahrt.

Die aufzutrennenden Peptide wurden in 50 %iger Ameisensäure gelöst und als 7.5 cm breite Startlinie aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte aufsteigend in Tanks mit Kammersättigung unter Verwendung folgender Fließmittel:

- a) Butanol-2/Ameisensäure/Wasser (70:9:21)
- b) Butanol-1/Essigsäure/Pyridin/Wasser (34:7:20:12.5)

Danach wurden an beiden Seiten der Chromatogramme je 1 cm breite Streifen mit Ninhydrin-Lösung ⁽⁶³⁾ und Pauly-Reagens ⁽⁶⁴⁾ besprüht. Von den entsprechenden Zonen des unbesprühten Plattenteils wurde das Sorptionsmittel abgeschabt und mit 1.4 ml 1 %iger Essigsäure digeriert. Dann wurde durch kleine G 4 Glasfiltertrichter filtriert und zweimal mit je 0.3 ml Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

Bei den papierchromatographischen Trennungen erfolgten die Auftragung der Proben und die Detektion der Zonen ähnlich wie bei der Dünnschichtchromatographie, die Entwicklung absteigend in Tanks ohne Kammersättigung (Laufzeit 15 bis 18 h). Aus den ausgeschnittenen Zonen wurden die getrennten Peptide durchflußchromatographisch mit 30%iger Essigsäure eluiert.

5.2.3 Kationenaustauscherchromatographie

Die Kationenaustauscherchromatographien wurden an einer Dowex 50 x 4 Säule (0.6 cm Ø, 105 cm lang) bei einer Temperatur von 40° C und einer Durchflußrate von 27 ml/h durchgeführt. Zur Regenerierung des in der Na⁺-Form vorliegenden Austauschers wurde dieser zunächst durch Elution mit 500 ml 2 M Pyridin/Acetat-Puffer pH 4.9 in die Pyridinium-Form überführt. Dann wurde der lyophilisierte Insulin B-Verdauungsansatz in 1.5 ml 50 %iger Ameisensäure gelöst und auf die Säule gegeben. So wurde gleichzeitig mit der Probenaufgabe der Austauscher in die H⁺-Form überführt. Zur Entwicklung diente folgendes Puffersystem:

- 1) 730 ml 0.05 M Pyridin/Acetat-Puffer pH 2.7
- 2) linearer Gradient aus 640 ml Puffer 1 und 640 ml 2 M Pyridin/Acetat pH 4.9
- 3) 0.5 N Natronlauge

Es wurden Fraktionen von 4.5 ml gesammelt und aus jeder 0.1 ml für die manuelle Ninhydrin-Reaktion entnommen.

5.2.4 Manueller Ninhydrin-Test (65)

Hierzu werden folgende Lösungen benötigt:

- 4 N Natronlauge
- 4 N Salzsäure
- 4 M Natriumacetat-Puffer pH 5.51
(enthält auf 1 l: 544 g Natriumacetat·3H₂O
100 ml Eisessig
7.5 ml Ameisensäure)
- 3 %ige Ninhydrinlösung in Äthylenglycolmono-
methyläther

Durchführung:

Aus jeder gesammelten Fraktion werden je nach Peptidkonzentration 0.05 bis 0.2 ml entnommen, mit 0,3 ml Natronlauge versetzt und in Polypropylenröhrchen 1 bis 1.5 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann werden die Proben mit je 0.3 ml Salzsäure neutralisiert, man gibt je 1 ml Puffer und Ninhydrinlösung zu, schüttelt um und erwärmt noch 15 Minuten im Wasserbad. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Extinktion der Proben bei 570 nm gemessen.

5.2.5. Identifizierung der Peptide

In fast allen Fällen war es möglich, durch Aminosäure-Analysen der Peptide diese bestimmten Sequenzen der Insulin B-Kette zuzuordnen und so die Lage der entsprechenden Spaltstellen eindeutig festzulegen. Hierzu wurden aliquote Teile der aufgetrennten Peptidfraktionen in 6 N Salzsäure unter Vakuum totalhydrolysiert (108° C, 20 h) und der Aminosäureanalyse unterworfen (Aminosäureanalysator BC 200, LKB Produkter, Stockholm).

Bei vier Peptiden war zur eindeutigen Identifizierung der Spaltstellen eine Bestimmung der endständigen Aminosäure erforderlich, die durch Dansylierung⁽⁶⁶⁾ erfolgte.

5.3. Präparative Methoden

Eine Reihe von Verbindungen, die als Substrate oder als Vorstufen zu Substraten für kinetische Messungen erforderlich waren, wurden nach den folgenden Methoden synthetisiert. Die hierzu verwendeten Lösungsmittel wurden vor der Verwendung nach bekannten Verfahren getrocknet und destilliert. Bei den Synthesen wurde auf Feuchtigkeitsausschluß (CaCl_2 -Rohr) geachtet.

5.3.1 BOC-L-alanin-4-nitrophenylester (MG 310.3) ⁽⁶⁷⁾

10 g BOC-L-alanin (53 mMol) und 8.8 g 4-Nitrophenol (63 mMol) wurden in 40 ml Essigester gelöst. Dann wurde unter Eiskühlung eine Lösung von 12 g Dicyclohexylcarbodiimid (58 mMol) in 25 ml Äthylacetat zugefügt und das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und mit Essigester ausgewaschen. Die Waschlösung wurde zusammen mit dem Filtrat eingengt und der zurückbleibende sirupöse Rückstand aus Aceton/Petroläther (1:1) kristallisiert. Da auch durch mehrfaches Umkristallisieren das Produkt nicht frei von überschüssigem Nitrophenol zu erhalten war, wurde der Ester nach einmaliger Umkristallisation für die weiteren Synthesen eingesetzt. Ausbeute 14.3 g (87 % d. Th.).

5.3.2 BOC-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-4-nitro- anilid (MG 451.2)

2 g L-Alanyl-L-alanin-4-nitroanilid (7.2 mMol) wurden in 100 ml Dichlormethan gelöst und 2.2 g BOC-L-alanin-4-nitrophenylester (7.1 mMol) zugegeben. Die Lösung wurde

über Nacht bei Raumtemperatur gehalten und dann eingeeengt. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit Aceton gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Farblose Kristalle, Smp. 221°C , Ausbeute 2.36 g (73 % d. Th.).

5.3.3 L-Alanyl-L-alanyl-L-alanin-4-nitroanilid-trifluoracetat (MG 465)

1.88 g BOC-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-4-nitroanilid (4.2 mMol) wurden in 10 ml Trifluoressigsäure (68) gelöst, wobei unter Aufschäumen die Deblockierung stattfand. Nach einer Stunde wurde die Trifluoressigsäure im Vakuum abdestilliert und das Produkt aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Farblose Nadelchen, Smp. 138°C (Zers.), Ausbeute 1.62 g (88 % d. Th.).

5.3.4 BOC-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid (MG 513.6)

2 g Glycyl-L-Phenylalanin-4-nitroanilid (5.85 mMol) wurden in 250 ml Chloroform gegeben, mit einer Lösung von 1.82 g BOC-L-alanin-4-nitrophenylester (5.85 mMol) in 150 ml Chloroform versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurde durch Ausschüteln mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonatlösung die Hauptmenge Nitrophenol entfernt, die organische Phase nach Trocknen mit Natriumsulfat eingeeengt und die ausgefallene Substanz aus Aceton/Äthanol umkristallisiert. Farblose Kristalle, Smp. 209°C (Zers.), Ausbeute 2.1 g (70 % d. Th.).

5.3.5 L-Alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitro-
anilid-trifluoracetat (MG 527.5)

1.8 g BOC-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid (3.5 mMol) wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur belassen ⁽⁶⁸⁾. Die Lösung wurde eingeengt, 20 ml Eisessig zugegeben und das Produkt durch vorsichtiges Zutropfen von Äther bis zur beginnenden Trübung und Stehenlassen im Kühlraum kristallisiert.

Farblose Kristalle, Smp. 173° C (Zers.),
Ausbeute 1.74 g (94 % d. Th.).

5.3.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Acetylierung
und Glutarylierung von Aminosäurenitroaniliden

Die synthetisierten sowie eine Reihe käuflicher Aminosäure-4-nitroanilide wurden nach folgendem Verfahren an der Aminogruppe acyliert:

1 mMol der umzusetzenden Verbindung wurde in 5 ml Pyridin gelöst und 1.1 mMol des Acylierungsmittels (Acetanhydrid bzw. Glutarsäureanhydrid) zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 40° C gehalten und dann ein Tropfen der Lösung mit Ninhydrin getüpfelt. War der Test positiv, wurde noch etwas Acylierungsmittel zugesetzt, bis die Ninhydrin-Reaktion ausblieb. Dann wurde das Pyridin im Vakuum abdestilliert und das zurückbleibende Produkt durch Umkristallisieren, meist aus Äthanol, gereinigt.

Ausbeuten und Schmelzpunkte der so dargestellten N-blockierten Aminosäure-4-nitroanilide sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

5.3.6.1 Tabelle der dargestellten an der Aminogruppe
geschützten Aminosäure-4-nitroanilide

Verbindung	Ausbeute	Schmelz- punkt
Acetyl-glycin-4-NA	85 %	>260°C Zers.
Acetyl-L-prolin-4-NA (a)	78 %	191°C
Acetyl-L-phenylalanin-4-NA	82 %	249°C
N.O-Diacetyl-L-tyrosin-4-NA *	92 %	214°C
Acetyl-glycyl-L-phenylalanin-4-NA	73 %	247°C Zers.
Acetyl-L-alanyl-L-alanin-4-NA	76 %	>270°C Zers.
Acetyl-L-alanyl-L-alanyl- L-alanin-4-NA (b)	90 %	>330°C Zers.
Glutaryl-glycin-4-NA	76 %	209°C
Glutaryl-L-tyrosin-4-NA (c)	79 %	203°C
Glutaryl-glycyl-L-phenyl- alanin-4-NA	71 %	199°C
Glutaryl-L-alanin-4-NA (c)	86 %	159°C
Glutaryl-L-alanyl-L-alanin-4-NA(c)	88 %	199°C
Glutaryl-L-alanyl-L-alanyl- L-alanin-4-NA	82 %	253°C
Glutaryl-L-alanyl-glycyl- L-phenylalanin-4-NA (d)	84 %	198°C

- (a) aus Äthanol/Wasser umkristallisiert
(b) aus Eisessig umkristallisiert
(c) aus Wasser umkristallisiert
(d) aus Methanol/Äther umkristallisiert

* N.O-Diacetyl-L-Tyrosin-4-NA wurde nach derselben Vorschrift mit der doppelten Menge Acylierungs-
Mittel hergestellt. Das ¹H-Kernresonanzspektrum
des Produktes stimmte mit der angegebenen Struk-
tur überein.

5.3.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung ringsubstituierter Phenylacetate

Die zur Synthese ringsubstituierter Phenylacetate verwendeten Phenole wurden durch Lösen in Natronlauge und vorsichtiges Ansäuern durch Zugabe von Salzsäure mehrmals umgefällt. Acetylchlorid und Acetanhydrid kamen frisch destilliert zum Einsatz. Die Phenylacetate wurden nach einer der folgenden Methoden ⁽⁴⁸⁾ hergestellt:

- 1) 0.1 Mol des Phenols wurde in 200 ml Benzol gelöst, 11 ml (112 mMol) Acetanhydrid zugegeben und drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Dann wurde der Reaktionsansatz mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und danach mit Wasser ausgeschüttelt, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Produkt wurde durch Umkristallisieren aus Petroläther/Äther oder durch Vakuumdestillation gereinigt.*
- 2) 0.1 Mol des Phenols wurde in 200 ml Benzol gelöst und 250 mg Magnesiumspäne zugegeben. Dann wurden 8.8 ml (125 mMol) Acetylchlorid langsam zugetropft und der Ansatz drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 1) .

Ausbeuten und Schmelzpunkte der synthetisierten Verbindungen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

* 4-Carboxyphenylacetat wurde folgendermaßen aufgearbeitet: Der nach Abdestillieren des Benzols verbleibende Rückstand wurde in warmer Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen. Nach Filtration wurde durch Ansäuern mit Salzsäure der Ester ausgefällt und aus Wasser/Äthanol (9:1) kristallisiert.

5.3.7.1 Tabelle der synthetisierten kernsubstituierten Phenylacetate

Substituent	MG	Sdp./mm Hg	Smp.	Literatur-Angabe	Ausb.	Synthese-Verfahren
-	136.2	87°C/20	-	-	-	-
3-Fluor	151.6	68°C/11	-	-	67 %	2
4-Fluor	151.6	77°C/11	-	Sdp. 81°C/15 (69)	63 %	2
3-Chlor	170.6	112°C/20	-	Sdp. 116.5°C/21 (70)	71 %	1
4-Chlor	170.6	114°C/21	-	Sdp. 108°C/12.5 (70)	69 %	1
3-Brom	215.0	112°C/11	-	Sdp. 149°C/40 (70)	73 %	2
4-Brom	215.0	75-7°C/0.5	-	Sdp. 128°C/35 (70)	77 %	2
3-Methyl	150.1	209°C/760	-	Sdp. 212°C/760 (71)	59 %	2
4-Methyl	150.1	212°C/760	-	Sdp. 210-3°C/760 (69)	71 %	2
3-Acetyl	178.2	148°C/19	45°C	Smp. 43-44°C (69)	58 %	1
4-Acetyl	178.2	159°C/19	53°C	Smp. 53-54°C (69)	75 %	1
4-Carboxy	180.1	-	184°C	Smp. 185°C (72)	50 %	1
4-Methoxy	166.1	133°C/20	-	Sdp. 134-5°C/18 (73)	82 %	1
3-Nitro	181.2	-	55°C	Smp. 54°C (69)	62 %	2

* Essigsäure-phenylester wurde von der Fa. Fluka bezogen und durch Destillation gereinigt.

5.4 Bestimmung der Enzymkonzentration

Die Konzentrationen der für kinetische Messungen verwendeten Proteinase K-Lösungen wurden spektralphotometrisch unter Benutzung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280} = 2.56 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (8) bestimmt.

5.5 Durchführung der kinetischen Messungen

Alle Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in 0.1 M Hepes-Pufferlösungen pH 7.0 durchgeführt. Die Wasserstoffionenkonzentration der Puffer wurde potentiometrisch mit Hilfe einer Einstab-Glaselektrode gemessen und der gewünschte pH durch Zugabe von Natronlauge eingestellt.

Stammlösungen der Substrate, meistens in Dimethylformamid, wurden durch Einwiegen der Verbindungen hergestellt und ihre Konzentrationen nach alkalischer Hydrolyse eines aliquoten Teils photometrisch überprüft.

Die Enzymkonzentration in den Testansätzen betrug maximal 10^{-6} M, so daß die Bedingungen für eine Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung eingehalten wurden. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Aminosäure-4-nitroanilid- und der Carbonsäure-4-nitrophenylesterspaltung wurden spektroskopisch bei 405 nm im Photometer Eppendorf (Netheler & Hinz), die der Phenylacetate bei den angegebenen Wellenlängen im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen. Beide Geräte waren mit auf 25° C thermostatisierten Küvettenhaltern ausgestattet. An die Geräte angeschlossene Kompensationsschreiber dienten zur Registrierung der Extinktionsänderungen.

Wenn die Löslichkeit der Substrate es zuließ, wurden Messungen im Konzentrationsbereich zwischen 0.2 K_M und 3 K_M durchgeführt. Die Michaelis-Menten-Parameter

wurden aus Messungen der Initialgeschwindigkeit der Reaktion bei mindestens fünf Substratkonzentrationen nach der Methode von Hanes ⁽⁷⁴⁾ ermittelt. Dazu wurde ein Tischrechner Programma 101 (Olivetti) benutzt, der nach einem auf der Methode von Wilkinson ⁽⁷⁵⁾ beruhenden Programm die kinetischen Konstanten berechnete.

5.5.1 Messung der pH-Abhängigkeit der Spaltung
von Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-
4-nitroanilid

Die Messung der pH-Abhängigkeit der Proteinase K-katalysierten Hydrolyse des spezifischen Substrates Glutaryl-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid erfolgte in einem von pH 3 bis pH 13 verwendbaren Universalpuffer, der durch Zusatz einer äquimolaren Menge Zitronensäure zu dem Äthanolamin-phosphat-Puffer nach Thies und Kallinich ⁽⁷⁶⁾ hergestellt wurde. Die Pufferlösung enthielt:

- 16.7 mM Monoäthanolaminphosphat, sekundär,
- 8.33 mM Triäthanolaminphosphat, primär,
- 25.0 mM Zitronensäure

Sie wurde mit Natronlauge auf den erforderlichen pH eingestellt und durch Zugabe von NaCl auf eine konstante Ionenstärke von $\mu = 0.3$ M gebracht.

Die Stabilität des Enzyms in diesem Puffer bei verschiedenen pH wurde durch zehnmünütige Inkubation und anschließende Aktivitätsmessung bei pH 7.0 überprüft. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte wie unter 5.5 beschrieben.

5.6 Untersuchung der Hydrolyseprodukte bei der enzymatischen Spaltung der Trialanin-nitroanilide

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der 4-Nitroanilin-Freisetzung (Tabelle 3, letzte Spalte) wurde die enzymatische Reaktion über mindestens sieben Halbwertszeiten verfolgt und die danach erreichte Extinktion bei 405 nm mit der einer in 1 N Natronlauge vollständig hydrolysierten Probe verglichen.

Um die Art der neben 4-Nitroanilin entstandenen Hydrolyseprodukte zu untersuchen, wurden Inkubationsansätze der Trialanin-4-nitroanilide mit Proteinase K der Dünnschichtelektrophorese in Ameisensäure-Essigsäure-Puffer pH 1.9 (950 V, 50 Minuten, Pherograph "Frankfurt", Hormuth & Vetter) unterworfen. Zur Anfärbung der getrennten Spaltprodukte wurden Ninhydrin ⁽⁶³⁾ und Kaliumjodid-Benzidin-Reagens ⁽⁷⁷⁾ benutzt. Dabei konnte als weiteres Bruchstück neben 4-Nitroanilin nur Alanin-4-nitroanilid, nicht aber Dialanin-4-nitroanilid nachgewiesen werden.

5.7 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der substituierten Phenole

Etwa 50 - 100 mg des entsprechenden Essigsäure-Phenylesters wurden in 4 ml 1 N methanolischer Kalilauge gelöst und 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Dann wurde auf 10 ml aufgefüllt, ein aliquoter Teil der Lösung mit 0.1 M Hepes pH 7.0 verdünnt und die Extinktion der Probe gegen eine nicht hydrolysierte Vergleichslösung gemessen.

5.8 Modifizierung der Proteinase K mit

Diäthylpyrocarbonat

Die Modifizierungsversuche mit Diäthylpyrocarbonat wurden in 0.06 M Natriumcitrat-Puffer pH 6.0 durchgeführt. Je 3 ml 3.5×10^{-5} M Proteinase K-Lösungen wurden mit 50 μ l einer Lösung von Diäthylpyrocarbonat in absolutem Äthanol versetzt. Ein Vergleichsansatz wurde entsprechend mit 50 μ l Äthanol inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden aliquote Teile der Ansätze entnommen und die Enzymaktivität in 0.1 M Hepes pH 7.0 (2.5 % Acetonitril enthaltend) mit 10^{-3} M 4-Nitrophenylacetat als Substrat gemessen. Die Zahl der modifizierten Histidinreste wurde spektroskopisch unter Benutzung eines Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{240} = 3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für N-Äthoxyformyl-Histidin (78) bestimmt und betrug bei 52 % Restaktivität 1.65 Histidinreste/18000 Dalton.

6 L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) D.E. Koshland jr. (1962) J. Theoret. Biol. 2, 75
- 2) R.M. Bell & D.E. Koshland jr. (1971) Science 172, 1253
- 3) J. Tonnelat (1974) Biochimie 56, 21
- 4) L.B. Spector (1973) Bioorg. Chem. 2, 311
- 5) B.D. Sykes, S.L. Patt & D. Dolphin (1971) Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol. 36, 29
- 6) P.v. Eikeren & D.M. Chipman (1972) J. Am. Chem. Soc. 94, 4788
- 7) W.P. Jencks (1975) Adv. Enzymol. 43, 219
- 8) W. Ebeling, N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H.D. Orth & H. Lang (1974) Eur. J. Biochem. 47, 91
- 9) K. Morihara & H. Tsuzuki (1975) Agr. Biol. Chem. 39, 1489
- 10) U. Wieggers & H. Hilz (1971) Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 513
- 11) H. Hilz, U. Wieggers & P. Adamietz (1975) Eur. J. Biochem. 56, 103
- 12) J.T. Johansen, M. Ottesen, I. Svendsen & G. Wybrandt (1968) C. R. Trav. Lab. Carlsberg 36, 365
- 13) K. Morihara & H. Tsuzuki (1969) Arch. Biochem. Biophys. 129, 620
- 14) T. Nakanishi & T. Yamamoto (1974) Agr. Biol. Chem. 38, 2391
- 15) H. Tuppy (1953) Monatsh. Chem. 84, 996
- 16) M.L. Bender, F.J. Kézdy & C.R. Gunter (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 3714
- 17) U. Femfert (1975), unveröffentlicht

- 18) J.K. Dattagupta, T. Fujiwara, E.V. Grishin, K. Lindner, P.C. Manor, N.J. Pieniazek, W. Saenger & D. Suck (1975) J. Mol. Biol. 97, 267
- 19) B. Zerner & M.L. Bender (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 3669
B. Zerner, R.P.M. Bond & M.L. Bender (ibid.), 3674
- 20) F.J. Kézdy, G.E. Clement & M.L. Bender (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 3690
- 21) H.P. Kasserra & K.J. Laidler (1969) Can. J. Chem. 47, 4031
- 22) H.P. Kasserra & K.J. Laidler (1970) Can. J. Chem. 48, 1793
- 23) M.L. Bender & F.J. Kézdy (1965) Ann. Rev. Biochem. 34, 49
- 24) H.F. Noller & S.A. Bernhard (1965) Biochemistry 4, 1118
- 25) G. Lowe & A. Williams (1964) Proc. Chem. Soc. 140
- 26) M.L. Bender & E.T. Kaiser (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 2556
- 27) M.L. Bender (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 2582
- 28) K.M. Flowman (1972) Enzyme Kinetics, 7, McGraw-Hill, New York
- 29) F.E. Brot & M.L. Bender (1969) J. Am. Chem. Soc. 91, 7187
- 30) M.L. Bender & F.J. Kézdy (1965) Ann. Rev. Biochem. 34, 64
- 31) H. Lachmann, M. Mauser, F. Schneider & H. Wenck (1971) Z. Naturforsch. 26 b, 629
- 32) I. Shechter & A. Berger (1967) Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 157
- 33) C. Tanford (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 4240
- 34) T.H. Marshall & A. Akgün (1971) J. Biol. Chem. 246, 6019

- 35) U. Femfert & P. Cichocki (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1332
- 36) H.S. Frank & W.Y. Wen (1957) Disc. Farad. Soc., 133,
- 37) H. Gutfreund & J.R. Knowles (1967) Essays in Biochemistry 3, 25
- 38) R.W. Taft (1956) Separation of Polar, Steric and Resonance Effects, in Steric Effects in Organic Chemistry (ed. M.S. Newman), 556, J. Wiley, New York
- 39) F. Becker (1961) Z. Naturforsch. 16 b, 236
- 40) D.M. Blow (1971) The Structure of Chymotrypsin, in The Enzymes Bd. 3 (ed. P.D. Boyer), 185, Academic Press, New York
- 41) C.A. Bauer, R.C. Thompson & E.R. Blout (1976) Biochemistry 15, 1296
- 42) C.A. Bauer, R.C. Thompson & E.R. Blout (1976) Biochemistry 15, 1291
- 43) T. Fujita, J. Iwasa & C. Hansch (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 5175
- 44) D.H. McDaniel & H.C. Brown (1958) J. Org. Chem. 23, 420
- 45) W.P. Jencks (1970) in Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology (ed. H.A. Sober) 2nd edn., J-195, Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio
- 46) R.W. Fuller, M.M. Marsh & J. Mills (1968) J. Med. Chem. 11, 397
- 47) T.C. Bruice & M.F. Mayahi (1960) J. Am. Chem. Soc. 82, 3067
- 48) M.L. Bender & K. Nakamura (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 2577
- 49) A. Williams & G. Woolford (1972) J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 272
- 50) G.S. Hammond (1955) J. Am. Chem. Soc. 77, 334

- 51) W.P. Jencks (1971) Cold Spring Harbor Sympos.
quant. Biol. 36, 1
- 52) P.N. Craig (1971) J. Med. Chem. 14, 680
- 53) L. Michaelis & H. Davidson (1911) Biochem. Z. 35, 368
- 54) K.J. Laidler & P. S. Bunting (1973) The Chemical
Kinetics of Enzyme Action, 2nd edn., 142, Clarendon
Press, Oxford
- 55) T. Inagami & J.M. Sturtevant (1964) Biochem. Biophys.
Res. Comm. 14, 69
- 56) T. Inagami, S.S. York & A. Patchornik (1965) J. Am.
Chem. Soc. 87, 126
- 57) C.A. Bauer & G. Pettersson (1974) Eur. J. Biochem.
45, 469
- 58) B.L. Vallee & J.F. Riordan (1969) Ann.Rev. Biochem.
38, 745
- 59) J. Ovádi, S. Libor & P. Elödi (1967) Acta Biochim.
Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 455
- 60) S. Ostermann-Golkar, L. Ehrenberg & F. Solomosi (1974)
Acta. Chem. Scand. B 28, 215
- 61) S. Fittkau (1963) Naturwiss. 50, 522
- 62) H. Zahn & F. Schade (1963) Chem. Ber. 96, 1747
- 63) R. Clotten & A. Clotten (1962) Hochspannungs-Elektro-
phorese 140, G. Thieme, Stuttgart
- 64) *ibid.* 156
- 65) C.H.W. Hirs (1967) Detection of Peptides by Chemical
Methods, in Methods in Enzymology Bd. 11 (ed. C.H.W.
Hirs) 325, Academic Press, New York
- 66) G. Pataki (1966) Dünnschichtchromatographie in der
Aminosäure- und Peptidchemie, 167, W. de Gruyter, Berlin

- 67) J. Bieth, B. Spiess & C.G. Wermuth (1974) Biochem. Med. 11, 350
- 68) H. Kappeler & R. Schwyzer (1960) Helv. Chim. Acta 43, 1453
- 69) A. Williams & R.A. Naylor (1971) J. Chem. Soc. 1967
- 70) W.J. Wohlleben (1909) Chem. Ber. 42, 4369
- 71) Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie (1923) 4. Aufl. 6, 379, J. Springer, Berlin
- 72) A. Kaufmann (1909) Chem. Ber. 42, 3480
- 73) A. Klemenc (1914) Monatsh. Chem. 35, 85
- 74) C.S. Hanes (1932) Biochem. J. 26, 1406
- 75) G.N. Wilkinson (1961) Biochem. J. 80, 324
- 76) H. Thies & G. Kallinich (1953) Biochem. Z. 324, 485
- 77) R. Clotten & A. Clotten (1962) Hochspannungs-Elektrophorese, 150, G. Thieme, Stuttgart
- 78) A. Mühlrad, G. Hegyi & M. Horanyi (1969) Biochim. Biophys. Acta 181, 184

Lebenslauf

Geboren am 13. 11. 1946 in Meschede

Schulbesuch 1953 - 1957 Grundschule
1957 - 1966 Gymnasium
24. 2. 1966 Abitur

Wehrdienst April 1966 - September 1967

Studium WS 1967 - SS 1970 Chemiestudium an der
Christian-Albrechts-Universität Kiel
20. 5. 1970 Vordiplomprüfung in Chemie
WS 1970 - WS 1971 Studium an der West-
fälischen Wilhelms-Universität Münster
ab SS 1972 Studium an der Ruhr-
Universität Bochum
26. 2. 1974 Diplom-Hauptprüfung in Chemie
Mai 1974 - Mai 1976 Dissertation an der
Abteilung Chemie der Ruhr-Universität
Bochum

